



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia
2009

**Sandra Maria
Gonçalves Rodrigues**

**Caracterização de *Sinorhizobium sp.* isolado de
Medicago sativa L.**



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia
2009

**Sandra Maria
Gonçalves Rodrigues**

**Caracterização de *Sinorhizobium* sp. isolado de
Medicago sativa L.**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular, realizada sob a orientação científica da Doutora Isabel Videira e Castro do Laboratório de Microbiologia do Solo, L-INIA, INRB, Oeiras e da Professora Doutora Etelvina Figueira, do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

o júri

Presidente

Doutora Maria de Lourdes Gomes Pereira
Professora Associada com Agregação ao Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro

Orientador interno

Doutora Etelvina Maria de Almeida Paula Figueira
Professora Auxiliar do Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro

Orientador externo

Doutora Isabel Maria da Silva Videira e Castro Viana
Investigadora Auxiliar, Instituto Nacional dos Recursos Biológicos, L-INIA

Doutora Paula Abranches Alvarinhas Fareleira
Investigadora Auxiliar, Instituto Nacional dos Recursos Biológicos, L-INIA

agradecimentos

Este trabalho, não se poderia realizar sem a ajuda e colaboração de algumas pessoas muito especiais a quem expresso o meu sentido agradecimento:

À minha orientadora Dra. Isabel Castro pela inteira disponibilidade para me orientar, e incansável paciência para me responder às minhas intermináveis dúvidas sempre com simpatia.

À minha orientadora Dra. Etelvina Figueira por me ter apresentado à Dra. Isabel e ter possibilitado este estágio.

Ao Eng.^o Eugénio Ferreira pelas sementes utilizadas neste trabalho e alguma orientação na execução do mesmo, e claro pela simpatia.

À técnica de laboratório Cristina Castro pelo apoio durante a execução dos meios, tratamento de material de laboratório, pelas leituras das densidades ópticas todas as sextas-feiras, etc. Mas acima de tudo pela amizade.

A todos os meus amigos que de uma maneira ou outra me ajudaram durante a execução deste trabalho.

Mas acima de tudo tenho de agradecer à minha família sem a qual nada seria possível, à minha irmã Catarina, mãe, pai, por sempre me terem apoiado, à minha avó pela sua confiança em mim ao ter “patrocinado” este mestrado.

Este trabalho foi elaborado no âmbito do projecto INCO-CT-2004-509140 (PERMED), intitulado: “Improvement of native perennial forage plants for sustainability of Mediterranean farming systems”.

palavras-chave

Sinorhizobium meliloti, *Sinorhizobium medicae*, tolerância, diversidade genética, salinidade, temperatura.

resumo

A utilização de luzernas (*Medicago sativa* L. e *Medicago polymorpha* L.) em pastagens na zona mediterrânea requer a inoculação de sementes com estirpes de *Sinorhizobium* (*S. meliloti* e *S. medicae*) eficazes e bem adaptadas às condições de clima semi-árido que prevalecem nesta região. Este trabalho teve como objectivo caracterizar a população de *Sinorhizobium* de um solo do Alentejo (Elvas-ENMP), isolada de nódulos de diferentes cultivares de *M. sativa* (ABT, Coussouls, Magali, Melissa e Mamuntanas), através da avaliação da diversidade genética e da eficácia simbiótica, bem como da tolerância a temperaturas elevadas (28 a 42°C) e à salinidade (0 a 1000 mM de NaCl). A análise dos perfis obtidos mediante REP e ERIC PCR permitiram determinar a existência de diversos "clusters", indicando uma elevada diversidade genética entre a população de *Sinorhizobium* estudada. Os resultados obtidos com os perfis de restrição do 16S rDNA, utilizando a enzima *RsaI* demonstraram uma prevalência de estirpes de *S. medicae* (73) em relação às estirpes de *S. meliloti* (18). Nos restantes parâmetros o comportamento das estirpes variou consoante a sua origem. Verificou-se a existência dum maior número de estirpes isoladas das cultivares Melissa e Mamuntanas com eficácia elevada, quando em simbiose com *M. polymorpha* e moderada com *M. sativa*, contrariamente às isoladas da cultivar Coussouls, que foram as menos eficazes com as duas espécies de *Medicago*. Relativamente à temperatura, foi na temperatura de 40°C que as estirpes tiveram comportamentos mais diferenciados desde muito sensíveis a muito tolerantes, existindo um grande número de estirpes das cultivares Coussouls, Melissa e Mamuntanas entre as últimas. Apenas duas estirpes toleraram a temperatura de 42°C, uma isolada de Coussouls e outra de Melissa. Nos ensaios de salinidade, a maioria das estirpes tolerou a concentração de 500 mM e sete toleraram a concentração de 1 M. Da totalidade de estirpes estudadas, apenas uma estirpe Melissa 5c apresentou elevada tolerância à temperatura e salinidade e simultaneamente uma eficácia simbiótica moderada.

keywords

Sinorhizobium meliloti, *Sinorhizobium medicae*, tolerance, genetic diversity, salinity, temperature.

abstract

The use of alfalfa (*Medicago sativa*, L. and *Medicago polymorpha*) in pastures in the Mediterranean area implies the inoculation of seeds with *Sinorhizobium* (*S. meliloti* and *S. medicae*) bacteria effective and well adapted to the semi-arid environmental conditions which prevails in this area. The aim of this work was to characterize *S. meliloti* natural population present in an Alentejo soil (Elvas-ENMP), isolated from nodules of different *M. sativa* varieties (ABT, Coussouls, Magali Mamuntanas and Melissa). Genetic diversity and symbiotic efficiency as well as the tolerance to high temperatures (28 to 42°C) and salinity (0 to 1000 mM of NaCl) were evaluated. Analyzing the different patterns obtained by REP and ERIC PCR, the existence of several clusters was verified, indicating a high genetic diversity among *Sinorhizobium* population studied. The results obtained with *RsaI* enzyme showed a prevalence of *S. medicae* strains (73) in relation to *S. meliloti* strains (18). Strains behaviour when facing high temperatures or salinity varied according to the host cultivar of origin. It was verified that a great number of strains isolated from cultivar Melissa and Mamuntanas had a high effectiveness, when in symbiosis with *M. polymorpha* and moderated with *M. sativa*, whereas strains isolated from cultivar Coussouls were poorly effective with both *Medicago* species. For tolerance to temperature, at 40°C the strains had different behaviours from very sensitive to very tolerant, existing a great number of strains from the cultivar Coussouls, Melissa and Mamuntanas among the last ones. Only two strains tolerated the temperature of 42°C, one isolated from Coussouls and another from Melissa. Salinity tests showed that almost all strains tolerate 500 mM, although seven tolerate 1 M. Among the strains studied, only one (Melissa 5c) has overcome the tests of tolerance, achieving medium values of nitrogen fixation.

ÍNDICE GERAL

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Importância do Azoto e da simbiose rizóbio-leguminosa	1
1.2. Taxonomia do rizóbio.....	2
1.3. Processo de infecção e nodulação das raízes pelas bactérias rizóbio	3
1.3.1. Genes de nodulação	3
1.3.2. Formação do nódulo	4
1.3.3. Fixação de Azoto	5
1.4. Diversidade microbiana	7
1.4.1. Métodos moleculares utilizados em estudos de diversidade de rizóbio	7
1.5. Influência de diferentes factores ambientais na sobrevivência de rizóbio	10
1.5.1. Temperatura.....	11
1.5.2. Salinidade	12
1.6. Objectivos.....	14
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
2.1. MATERIAIS	15
2.1.1. Material biológico	15
2.1.2. Meios de cultura	15
2.1.3. Tampões	17
2.1.4. Agaroses	18
2.2. MÉTODOS	18
2.2.1. Isolamento de bactérias	18
2.2.2. Caracterização das colónias em Vermelho de Congo	19
2.2.3. Caracterização em Azul de Bromotimol	19
2.2.4. Germinação de sementes	20
2.2.5. Avaliação da eficiência simbiótica.....	20
2.2.6. Ensaio de tolerância	21
2.2.6.1. Temperatura.....	21
2.2.6.2. Salinidade	21
2.2.7. Caracterização molecular das estirpes de <i>Sinorhizobium</i> sp.	22
2.2.7.1. Extração de DNA genómico.....	22
2.2.7.2. Fundamentos da técnica de PCR	23
2.2.7.3. Análise de DNA genómico por REP-PCR e ERIC-PCR	25
2.2.7.4. Amplificação do 16S-rDNA.....	28
2.2.7.4.1. Utilização da enzima <i>RsaI</i>	29
2.2.7.5. Amplificação do gene <i>nodC</i>	30
2.2.7.6. Coloração de géis.....	31
2.2.7.7. Análise de resultados	32
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
3.1. Caracterização morfológica dos isolados de <i>Sinorhizobium</i>	33
3.1.1. Caracterização das colónias em Vermelho de Congo	33
3.1.2. Caracterização em azul de bromotimol	34
3.2. Avaliação da eficiência simbiótica.....	35
3.3. Ensaio de tolerância	39
3.3.1. Controlos	39
3.3.2. Temperatura.....	42
3.3.3. Salinidade	48

3.4.	Análise de DNA genómico.....	53
3.4.1.	DNA total	53
3.4.2.	REP-PCR.....	54
3.4.3.	ERIC-PCR	57
3.4.4.	16S rDNA.....	60
3.4.5.	Utilização da enzima <i>RsaI</i>	61
3.4.6.	NodC.....	65
3.4.7.	Conjugação dos resultados obtidos por REP-PCR, ERIC-PCR, <i>RsaI</i> e relação com a eficácia simbiótica e tolerância à temperatura e salinidade	67
4.	DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES.....	74
5.	BIBLIOGRAFIA	77
	ANEXO.....	92

ÍNDICE DAS FIGURAS

Figura 1: Estabelecimento da simbiose de <i>Sinorhizobium meliloti</i> - <i>Medicago sativa</i>	6
Figura 2: Iniciação da amplificação de DNA.	24
Figura 3: Esquema representativo da amplificação de DNA por PCR.....	25
Figura 4: PCR/RFLP de 16S rDNA, perfis de restrição de <i>RsaI</i>	29
Figura 5: A, B, C e D – Colónias crescidas em placas de AML com Vermelho de Congo.....	33
Figura 6: Culturas crescidas em placas de meio AML com azul de bromotimol.....	34
Figura 7: Peso Seco (mg), da parte aérea de plantas de <i>Medicago sativa</i> cultivar ABT, inoculadas com estirpes de <i>Sinorhizobium</i>	35
Figura 8: Peso Seco (mg), da parte aérea de plantas de <i>Medicago sativa</i> cultivar Magali, inoculadas com estirpes de <i>Sinorhizobium</i>	36
Figura 9: Peso Seco (mg), da parte aérea de plantas de <i>Medicago sativa</i> cultivar Coussouls, inoculadas com estirpes de <i>Sinorhizobium</i>	36
Figura 10: Peso Seco (mg), da parte aérea de plantas de <i>Medicago sativa</i> cultivar Mamuntanas, inoculadas com estirpes de <i>Sinorhizobium</i>	37
Figura 11: Peso Seco (mg), da parte aérea de plantas de <i>Medicago sativa</i> cultivar Melissa, inoculadas com estirpes de <i>Sinorhizobium</i>	37
Figura 12: Peso Seco (mg), da parte aérea de plantas de <i>Medicago polymorpha</i> , inoculadas com estirpes de <i>Sinorhizobium</i>	38
Figura 13: Curvas de crescimento (expressas em valores de DO _{600nm}) das estirpes de <i>Sinorhizobium</i> isoladas da cultivar ABT	39
Figura 14: Curvas de crescimento (expressas em valores de DO _{600nm}) das estirpes de <i>Sinorhizobium</i> isoladas da cultivar Magali.....	40
Figura 15: Curvas de crescimento (expressas em valores de DO _{600nm}) das estirpes de <i>Sinorhizobium</i> isoladas da cultivar Coussouls.....	40
Figura 16: Curvas de crescimento (expressas em valores de DO _{600nm}) das estirpes de <i>Sinorhizobium</i> isoladas da cultivar Mamuntanas	41
Figura 17: Curvas de crescimento (expressas em valores de DO _{600nm}) das estirpes de <i>Sinorhizobium</i> isoladas da cultivar Melissa.....	41
Figura 18: Resultados referentes aos valores de DO ₆₀₀ obtidos para as estirpes da cultivar ABT obtidos ao fim de 6 dias, para as temperaturas de 28, 32, 36, 40 e 42°C.	42
Figura 19: Resultados referentes aos valores de DO ₆₀₀ em percentagem em relação ao controlo, obtidos para as estirpes da cultivar Magali obtidos ao fim de 6 dias, para as temperaturas de 28, 32, 36, 40 e 42°C..	43
Figura 20: Resultados referentes aos valores de DO ₆₀₀ em percentagem em relação ao controlo, obtidos para as estirpes da cultivar Coussouls obtidos ao fim de 6 dias, para as temperaturas de 28, 32, 36, 40 e 42°C.	43
Figura 21: Resultados referentes aos valores de DO ₆₀₀ em percentagem em relação ao controlo, obtidos para as estirpes da cultivar Melissa obtidos ao fim de 6 dias, para as temperaturas de 28, 32, 36, 40 e 42°C..	44
Figura 22: Resultados referentes aos valores de DO ₆₀₀ em percentagem em relação ao controlo, obtidos para as estirpes da cultivar Mamuntanas obtidos ao fim de 6 dias, para as temperaturas de 28, 32, 36, 40 e 42°C.....	44

Figura 23: Resultados referentes aos valores de DO ₆₀₀ obtidos para as estirpes da cultivar ABT quando submetidas, durante 6 dias, à temperatura de 40°C.	45
Figura 24: Resultados referentes aos valores de DO ₆₀₀ obtidos para as estirpes da cultivar Magali quando submetidas, durante 6 dias, à temperatura de 40°C.	45
Figura 25: Resultados referentes aos valores de DO ₆₀₀ obtidos para as estirpes da cultivar Coussouls quando submetidas, durante 6 dias, à temperatura de 40°C.	46
Figura 26: Resultados referentes aos valores de DO ₆₀₀ obtidos para as estirpes da cultivar Mamuntanas quando submetidas, durante 6 dias, à temperatura de 40°C.	46
Figura 27: Resultados referentes aos valores de DO ₆₀₀ obtidos para as estirpes da cultivar Melissa quando submetidas, durante 6 dias, à temperatura de 40°C.	47
Figura 28: Resultados referentes aos valores de DO ₆₀₀ em percentagem em relação ao controlo, obtidos para as estirpes da cultivar ABT obtidos ao fim de 6 dias, para as concentrações de NaCl de 0, 20, 100, 500 mM e 1M.	48
Figura 29: Resultados referentes aos valores de DO ₆₀₀ em percentagem em relação ao controlo, obtidos para as estirpes da cultivar Magali obtidos ao fim de 6 dias, para as concentrações de NaCl de 0, 20, 100, 500 mM e 1M.	49
Figura 30: Resultados referentes aos valores de DO ₆₀₀ em percentagem em relação ao controlo, obtidos para as estirpes da cultivar Coussouls obtidos ao fim de 6 dias, para as concentrações de NaCl de 0, 20, 100, 500 mM e 1M.	49
Figura 31: Resultados referentes aos valores de DO ₆₀₀ em percentagem em relação ao controlo, obtidos para as estirpes da cultivar Mamuntanas obtidos ao fim de 6 dias, para as concentrações de NaCl de 0, 20, 100, 500 mM e 1M.	50
Figura 32: Resultados referentes aos valores de DO ₆₀₀ em percentagem em relação ao controlo, obtidos para as estirpes da cultivar Melissa obtidos ao fim de 6 dias, para as concentrações de NaCl de 0, 20, 100, 500 mM e 1M.	50
Figura 33: Resultados referentes aos valores de DO ₆₀₀ obtidos para as estirpes da cultivar ABT quando submetidas, durante 6 dias, à concentração de NaCl de 500 mM.	51
Figura 34: Resultados referentes aos valores de DO ₆₀₀ obtidos para as estirpes da cultivar Magali quando submetidas, durante 6 dias, à concentração de NaCl de 500 mM.	51
Figura 35: Resultados referentes aos valores de DO ₆₀₀ obtidos para as estirpes da cultivar Coussouls quando submetidas, durante 6 dias, à concentração de NaCl de 500 mM.	52
Figura 36: Resultados referentes aos valores de DO ₆₀₀ obtidos para as estirpes da cultivar Mamuntanas quando submetidas, durante 6 dias, à concentração de NaCl de 500 mM.	52
Figura 37: Resultados referentes aos valores de DO ₆₀₀ obtidos para as estirpes da cultivar Melissa quando submetidas, durante 6 dias, à concentração de NaCl de 500 mM.	53
Figura 38: Géis de electroforese em agarose 1% correspondente às amostras de DNA genómico extraído de estirpes de <i>Sinorhizobium</i>	53
Figura 39: Gel de electroforese e respectivo dendograma, resultante da amplificação por REP-PCR, referente às estirpes de <i>Sinorhizobium</i> isoladas da cultivar ABT. ...	54
Figura 40: Gel de electroforese e respectivo dendograma, resultante da amplificação por REP-PCR, referente às estirpes de <i>Sinorhizobium</i> isoladas da cultivar Magali.	55

Figura 41: Gel de electroforese e respectivo dendograma, resultante da amplificação por REP-PCR, referente às estirpes de <i>Sinorhizobium</i> isoladas da cultivar Coussouls.	55
Figura 42: Géis de electroforese e respectivo dendograma, resultante da amplificação por REP-PCR, referentes às estirpes de <i>Sinorhizobium</i> isoladas da cultivar Mamuntanas.	56
Figura 43: Géis de electroforese e respectivo dendograma, resultante da amplificação por REP-PCR, referente às estirpes de <i>Sinorhizobium</i> isoladas da cultivar Melissa.	57
Figura 44: Gel de electroforese e respectivo dendograma, resultante da amplificação por ERIC-PCR, referente às estirpes de <i>Sinorhizobium</i> isoladas da cultivar ABT...	57
Figura 45: Gel de electroforese e respectivo dendograma, resultante da amplificação por ERIC-PCR, referente às estirpes de <i>Sinorhizobium</i> isoladas da cultivar Magali.	58
Figura 46: Gel de electroforese e respectivo dendograma, resultante da amplificação por ERIC-PCR, referente às estirpes de <i>Sinorhizobium</i> isoladas da cultivar Coussouls.	58
Figura 47: Géis de electroforese e respectivo dendograma, resultante da amplificação por ERIC-PCR, referente às estirpes de <i>Sinorhizobium</i> isoladas da cultivar Mamuntanas.	59
Figura 48: Géis de electroforese e respectivo dendograma, resultante da amplificação por ERIC-PCR, referente às estirpes de <i>Sinorhizobium</i> isoladas da cultivar Melissa.	60
Figura 49: Gel electroforese de 16S rDNA, Resultados referentes às estirpes de <i>Sinorhizobium</i> isoladas de Mamuntanas (MM17- MM20) e Melissa (ML1a – ML10b).	61
Figura 50: Resultados de RFLP do gene 16S rDNA com a enzima de restrição <i>RsaI</i> , para as estirpes de <i>Sinorhizobium</i> isoladas de Melissa (ML11a- ML20) e ABT (A1 - A7).	61
Figura 51: Resultados de RFLP de 16S rDNA com a enzima de restrição <i>RsaI</i> , para as estirpes de <i>Sinorhizobium</i> isoladas de ABT (A8- A20) e Magali (M1 - M3).	62
Figura 52: Resultados de RFLP de 16S rDNA com enzima <i>RsaI</i> , para Magali (M5- M19) e para as estirpes de <i>Sinorhizobium</i> isoladas de Coussouls (C1 e C2).	62
Figura 53: Resultados de RFLP de 16S rDNA com enzima <i>RsaI</i> , para as estirpes de <i>Sinorhizobium</i> isoladas de Coussouls (C5- C18).	62
Figura 54: Resultados de RFLP de 16S rDNA com a enzima de restrição <i>RsaI</i> , para as estirpes de <i>Sinorhizobium</i> isoladas de Mamuntanas (MM1- MM16)	63
Figura 55: Resultados de RFLP de 16S rDNA com a enzima de restrição <i>RsaI</i> , para as estirpes de <i>Sinorhizobium</i> isoladas de Mamuntanas (MM17- MM20) e Melissa (ML1a- ML10b).	63
Figura 56: Resultados referentes a nodC - PCR, para as estirpes de <i>Sinorhizobium</i> isoladas de Melissa (ML1a - ML14).	65
Figura 57: Resultados referentes a nodC - PCR, para as estirpes de <i>Sinorhizobium</i> isoladas de Melissa (ML16 - ML20) e Mamuntanas (MM1 - MM14).	65
Figura 58: Resultados referentes a nodC - PCR, para as estirpes de <i>Sinorhizobium</i> isoladas de Mamuntanas (MM15 - MM20) e ABT (A1 - A12)	65
Figura 59: Resultados referentes a nodC - PCR, para as estirpes de <i>Sinorhizobium</i> isoladas de ABT (A13 - A20) e Magali (M1 -M8a).	66

Figura 60: Resultados referentes a nodC - PCR, para as estirpes de <i>Sinorhizobium</i> isoladas de Magali (M9 - M19) e Coussouls (C1 - C7)	66
Figura 61: Resultados referentes a nodC - PCR, para as estirpes de <i>Sinorhizobium</i> isoladas de Coussouls (C8 - C18).	66
Figura 62: Dendogramas obtidos após a análise em conjunto, dos resultados de REP e ERIC PCR, mostrando as relações genéticas existentes entre as estirpes de cada cultivar.	67
Figura 63: Dendograma obtido com os resultados de REP-PCR e ERIC-PCR conjugados, mostrando as semelhanças genéticas.	70
Figura 64: Valores de peso seco da parte aérea das plantas de <i>M. sativa</i> e <i>M. polymorpha</i> , referentes aos resultados obtidos para as estirpes das 5 cultivares.	72
Figura 65: Gel de electroforese, resultante da amplificação por REP-PCR, referente aos isolados de <i>S. meliloti</i> das cultivares ABT e Coussouls.	107
Figura 66: Gel electroforese de 16S rDNA, Resultados referentes às estirpes de Mamuntanas (MM1- MM16)	107
Figura 67: Gel electroforese de 16S rDNA, Resultados referentes às estirpes de Melissa (ML11a- ML20) e ABT (A1 - A7).	108
Figura 68: Gel electroforese de 16S rDNA, Resultados referentes às estirpes de ABT (A8- A20) e Magali (M1 – M3).	108
Figura 69: Gel electroforese de 16S rDNA, Resultados referentes às estirpes de Magali (M5- M19) e Coussouls (C1 e C2)	109
Figura 70: Gel electroforese de 16S rDNA, Resultados referentes às estirpes de Coussouls (C5- C18).	109

INDICE DAS TABELAS

Tabela 1: Fontes de informação taxonómica.....	9
Tabela 2: Temperaturas utilizadas na reacção de REP-PCR.....	27
Tabela 3: Temperaturas utilizadas na reacção de ERIC-PCR.....	27
Tabela 4: Temperaturas utilizadas na reacção de 16S rDNA-PCR.....	29
Tabela 5: Temperaturas utilizadas na reacção de nodC-PCR.....	31
Tabela 6: Pesos moleculares do marcador de 1Kb.....	32
Tabela 7: Resultados da identificação com a utilização da enzima de restrição <i>RsaI</i>	64
Tabela 8: Distribuição das estirpes pelos grupos.	71
Tabela 9: Diferenciação entre características exibidas pelas 107 estirpes de <i>Sinorhizobium</i>	73
Tabela 10: Resultados de DO (600 nm) em % em relação ao controle, de tolerância a diferentes temperaturas, para cada estirpe da cultivar ABT.	92
Tabela 11: Resultados de DO (600 nm) em % em relação ao controle, de tolerância a diferentes temperaturas, para cada estirpe da cultivar Magali.....	93
Tabela 12: Resultados de DO (600 nm) em % em relação ao controle de tolerância a diferentes temperaturas, para cada estirpe da cultivar Coussouls.....	94
Tabela 13: Resultados de DO (600 nm) em % em relação ao controle, de tolerância a diferentes temperaturas, para cada estirpe da cultivar Melissa.....	95
Tabela 14: Resultados de DO (600 nm) em % em relação ao controle, de tolerância a diferentes temperaturas, para cada estirpe da cultivar Mamuntanas.	96
Tabela 15: Resultados de DO (600 nm) em % em relação ao controle, de tolerância a diferentes concentrações de NaCl, para as estirpes da cultivar ABT.	97
Tabela 16: Resultados de DO (600 nm) em % em relação ao controle, de tolerância a diferentes concentrações de NaCl, para as estirpes da cultivar Magali.....	98
Tabela 17: Resultados de DO (600 nm) em % em relação ao controle, de tolerância a diferentes concentrações de NaCl, para as estirpes da cultivar Coussouls.....	99
Tabela 18: Resultados de DO (600 nm) em % em relação ao controle, de tolerância a diferentes concentrações de NaCl, para as estirpes da cultivar Melissa.....	100
Tabela 19: Resultados de DO (600 nm) em % em relação ao controle, de tolerância a diferentes concentrações de NaCl, para as estirpes da cultivar Mamuntanas...	101
Tabela 20: Resultados de Eficiência Simbiótica Relativa (%), para as estirpes da cultivar ABT	102
Tabela 21: Resultados de Eficiência Simbiótica Relativa (%), para as estirpes da cultivar Coussouls.	103
Tabela 22: Resultados de Eficiência Simbiótica Relativa (%), para as estirpes da cultivar Magali.	104
Tabela 23: Resultados de Eficiência Simbiótica Relativa (%), para as estirpes da cultivar Melissa.	105
Tabela 24: Resultados de Eficiência Simbiótica Relativa (%), para as estirpes da cultivar Mamuntanas.....	106

ABREVIATURAS

AML	Agar manitol levedura
BTB	Azul de bromotimol
DNA	“Desoxiribonucleic Acid”
ERIC	“Enterobacterial repetitive intergeneric consensus”
g	Grama
ML	Manitol levedura
ml	Mililitro
mM	Milimolar
pb	Pares de bases
PCR	“Polimerase chain reaction”
REP	“Repetitive extragenic palindromic”
TY	“Tryptone-yeast”
UV	Ultravioleta
VC	Vermelho de Congo
ESR	Eficiência Simbiótica Relativa

1. INTRODUÇÃO

1.1. Importância do Azoto e da simbiose rizóbio-leguminosa

Os microrganismos do solo desempenham um papel importante na manutenção da fertilidade do solo em relação à nutrição da planta. Com a excepção da água, o azoto é geralmente considerado o factor mais limitante para o crescimento das plantas no seu ambiente natural (Franco & Döbereiner, 1994). O aumento da população no século XX foi suportado, primeiro, pelo azoto obtido através do processo de Haber-Bosch, sendo necessário cerca de 1,3 toneladas de combustível fóssil para fixar 1 tonelada de azoto, segundo, pela Revolução Verde, que aumentou a produção de cereais associada a utilização, em doses elevadas, deste tipo de fertilizante químico. Anualmente cerca de 77×10^6 toneladas de azoto são aplicadas globalmente como fertilizante, o que corresponde a cerca de 91×10^9 toneladas por ano de combustível fóssil. Além do alto consumo de combustível, associado à emissão de CO_2 que contribuiu para o aquecimento global, existem outros problemas associados à aplicação de Azoto tais como: a contaminação da água e alimentos por NO_3 e NO_2^- , a toxicidade das plantas pela presença de altos níveis de NO_2^- nos solos; alteração no desenvolvimento das plantas pelo excesso de N (Bohlool *et al.* 1992; Döbereiner, 1992; Sprent & Sprent, 1990).

Considerando que a atmosfera terrestre é composta por 78% de gás N_2 , a introdução do azoto atmosférico, via fixação biológica de azoto (FBA), no circuito dos ciclos biogeoquímicos do azoto tem efeitos positivos no ambiente e na economia (Stacey *et al.*, 1992). A FBA é o processo pelo qual o azoto atmosférico é incorporado em compostos orgânicos. Este processo constitui a principal via de incorporação de azoto no ecossistema, que constantemente é reciclado para a atmosfera principalmente pela acção de organismos decompositores de matéria orgânica do solo. Desta forma, a acção de microrganismos fixadores de azoto e desnitrificadores garante um reservatório inesgotável de azoto na atmosfera. Além de garantir um ecossistema em equilíbrio, a redução da aplicação de doses excessivas de compostos azotados, como por exemplo o nitrato, que contamina as águas e os vegetais consumidos pelo homem, possibilita o

desenvolvimento de uma agricultura menos agressiva para o ambiente. A estimativa é de que a contribuição de azoto fixado biologicamente varia de 139 a 170x10⁶ toneladas de azoto por ano, pelo menos o dobro da fixação química (Peoples & Craswell, 1992).

Um dos contributos dados pelas associações simbióticas, envolve a troca directa de nutrientes inorgânicos por hidratos de carbono fotossintéticos (Giménez, 1992). As bactérias dos nódulos radiculares, genericamente designadas como rizóbio podem viver como bactérias livres no solo ou em simbiose com plantas da família *Fabaceae* (*Leguminosae*) (Bedmar *et al.*, 2006) no interior de nódulos radiculares onde se diferenciam em bacteróides e onde são capazes de converter o N₂ atmosférico em amoníaco, que é usado pela planta como fonte de azoto principalmente em solos pobres em nutrientes (Gage, 2004; Long, 2001; Oke & Long, 1999; Spaink, 2000). Das plantas que têm a capacidade de estabelecer uma simbiose efectiva com o rizóbio, fazem parte as luzernas, que são plantas forrageiras de zonas temperadas, que contribuem substancialmente para o ciclo de azoto (N) dos sistemas culturais, encontrando-se frequentemente expostas a baixa disponibilidade de água (<400 mm de precipitação por ano), solos deficientes em azoto e condições de temperaturas elevadas durante o verão (Peoples & Baldock, 2001).

1.2. Taxonomia do rizóbio

As bactérias fixadoras de azoto em simbiose com as leguminosas encontram-se distribuídas por 11 géneros: *Sinorhizobium* (*Ensifer*), *Allorhizobium*, *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Blastobacter*, *Methylobacterium*, *Azorhizobium*, *Devosia*, *Burkholderia* e *Ralstonia* (Bedmar *et al.*, 2006). O género *Sinorhizobium* pertence à família das *Rhizobiaceas* subdivisão das alfa-proteobacterias, em conjunto com importantes bactérias patogénicas humanas como a *Bartonella* e a *Brucella*, e com várias outras bactérias associadas a plantas de grande importância agrícola, como *Agrobacterium*, *Ochrobacterium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* e *Rhizobium* (Teyssier *et al.*, 2004). As espécies *Sinorhizobium meliloti* e *Sinorhizobium medicae*, são geneticamente muito próximas, encontrando-se distribuídas a nível mundial e formam nódulos fixadores de azoto em simbiose com plantas leguminosas, dos géneros *Medicago*, *Melilotus* e *Trigonella* incluindo a luzerna (*Medicago sativa* L.). *S. medicae*

tem a particular capacidade de nodular e fixar azoto com espécies de luzernas anuais, como a *Medicago polymorpha* (Brunel *et al.*, 1996) ou *Medicago arabica* (Biondi *et al.*, 2003).

1.3. Processo de infecção e nodulação das raízes pelas bactérias rizóbio

Como mencionado acima, os rizóbios são membros taxonomicamente diversos das α -proteobacteria, que podem existir como saprófitos de vida livre no solo ou em simbiose com plantas leguminosas. Esta última interação é iniciada pela troca de complexos sinais moleculares que conferem especificidade de hospedeiro. As raízes das plantas e as sementes excretam muitos compostos diferentes para o solo, alguns permitem o crescimento de microrganismos na rizosfera. Entre esses compostos encontram-se carboidratos, aminoácidos, ácidos orgânicos, vitaminas e derivados fenólicos. Os genes requeridos para a nodulação e fixação têm sido extensivamente estudados em *S. meliloti*. Muitos estão localizados em dois grandes plasmídeos, com cerca de 1,4Mpb e 1,7Mpb em tamanho, conhecidos como plasmídeos *nod* e *exo*, respectivamente (Finan *et al.*, 1986; Rosenberg *et al.*, 1981). Estes megaplasmídeos, incluem genes essenciais e são aparentemente comuns a todas as estirpes (Watson & Heys, 2005). O primeiro, é também conhecido como plasmídeo SYM, contém numerosos genes de nodulação e de fixação. O megaplasmídeo *exo* contém um conjunto de genes necessários ao suporte de uma fixação eficiente. Nestes estão incluídos os genes para a síntese de exopolissacarídeos e transporte de dicarboxilatos (Finan *et al.*, 1986; Hynes *et al.*, 1986; Eardly *et al.*, 1990).

1.3.1. Genes de nodulação

Os genes de nodulação podem ser incluídos em três classes designadas como comuns, específicos do hospedeiro e *nodD*. O primeiro gene envolvido na nodulação *nodD* é o único que é constitutivamente expresso (Long, 1989). A proteína que codifica, *NodD*, é um membro da família LysR de activadores transcricionais (Schell, 1993) e causa a transcrição de outros genes *nod*, quando activado em resposta a um estímulo específico (flavonóides) por parte da planta. Os flavonóides secretados pelas plantas induzem as

bactérias a secretar sinais moleculares, conhecidos como factores Nod (Heldmaier & Werner, 2003). A habilidade do NodD para reagir a flavonas específicas é uma parte chave que determina a gama de plantas hospedeiras que cada espécie de rizóbio consegue nodular. *R. leguminosarum* bv. *Viciae*, por exemplo, responde a hesperitina (Laeremans & Vanderleyden, 1998), que é libertada por exemplo pelas raízes da ervilheira, enquanto *S. meliloti* contém três genes *nodD*, permitindo uma resposta a um número de flavonóides maior, e assim a um maior número de plantas leguminosas (Honma *et al.*, 1990). Os genes *nod* comuns são os *nodABC*, e qualquer mutação nestes genes evita a formação de nódulos em raízes de plantas inoculadas (De Bruijn & Downie, 1991). As proteínas codificadas por *nodABC*, NodA (acil-transferase), NodB (deacetilase) e NodC (N-acetilglucosaminiltransferase) funcionam em conjunto para catalisar a síntese da estrutura nuclear essencial para a formação do nódulo (Geremia *et al.*, 1994; Spaink, 1996; Perret *et al.*, 2000). O gene *nodC* é um marcador do início da nodulação, sendo um gene comum e essencial para a nodulação em todas as espécies investigadas até agora. A proteína codificada por este gene está envolvida no primeiro passo para a constituição dos factores Nod, sendo também determinante da gama de hospedeiros (Perret *et al.*, 2000).

Muitos mais genes *nod* estão envolvidos no processo de nodulação, diferindo em termos de organização e número entre diferentes espécies, mas em conjunto os genes *nod* sintetizam moléculas conhecidas como factores Nod, que iniciam a formação do nódulo na planta.

1.3.2. Formação do nódulo

Como se pode ver na Figura 1, após a produção de factores Nod, as bactérias rodeiam e agregam-se à raiz, causando o enrolamento do pêlo radicular (Yao & Vincent, 1969). Os rizóbios apanhados no enrolamento da raiz, ou entre um pêlo e outra célula, proliferam e começam a infectar as células externas da planta, o que por sua vez estimula a produção por parte das células da planta, de cordões de infecção (Callaham & Torrey, 1981). As bactérias libertadas dos cordões de infecção para o citoplasma das células da planta, são

rodeadas pela membrana citoplasmática da planta e rapidamente começam a replicar o seu DNA e a dividir-se antes de pararem ambos os processos (Robertson *et al.*, 1978). Finalmente, as formas endosimbióticas das bactérias (referidas como bacteróides) constituem o nódulo que começa a fixar azoto pela acção da enzima nitrogenase (Xi *et al.*, 2000). Nódulos formados em diferentes plantas por diferentes bactérias demonstram ter as mesmas etapas de desenvolvimento.

1.3.3. Fixação de Azoto

A fixação simbiótica de N_2 em leguminosas começa apenas após o estabelecimento de nódulos eficazes. A planta fornece à bactéria um ambiente com quantidades controladas de oxigénio, ácidos dicarboxílicos e uma fonte de energia, malato, succinato ou glutamato, em troca a bactéria fixa, isto é, reduz o gás atmosférico N_2 a NH_3 (Bergersen, 1965), fornecendo aspartato, alanina e amónia à planta, este último para a formação de outros aminoácidos e outros compostos azotados (Lodwing, 2003). Sendo a nitrogenase, a enzima responsável pela fixação de N_2 , e sendo esta desactivada pelo O_2 , os nódulos das leguminosas evoluíram de modo a reduzir a permeabilidade dos nódulos ao O_2 , mas mantendo a sua concentração a cerca de 5-50 μM nas células infecciosas. Este valor é extremamente baixo em comparação com os aproximadamente 250 μM nas células em equilíbrio com o ar (Deninson *et al.*, 1992; Hunt & Layzell, 1993; King & Layzell, 1991; Kuzma *et al.*, 1993; Minchin, 1997; Witty *et al.*, 1987).

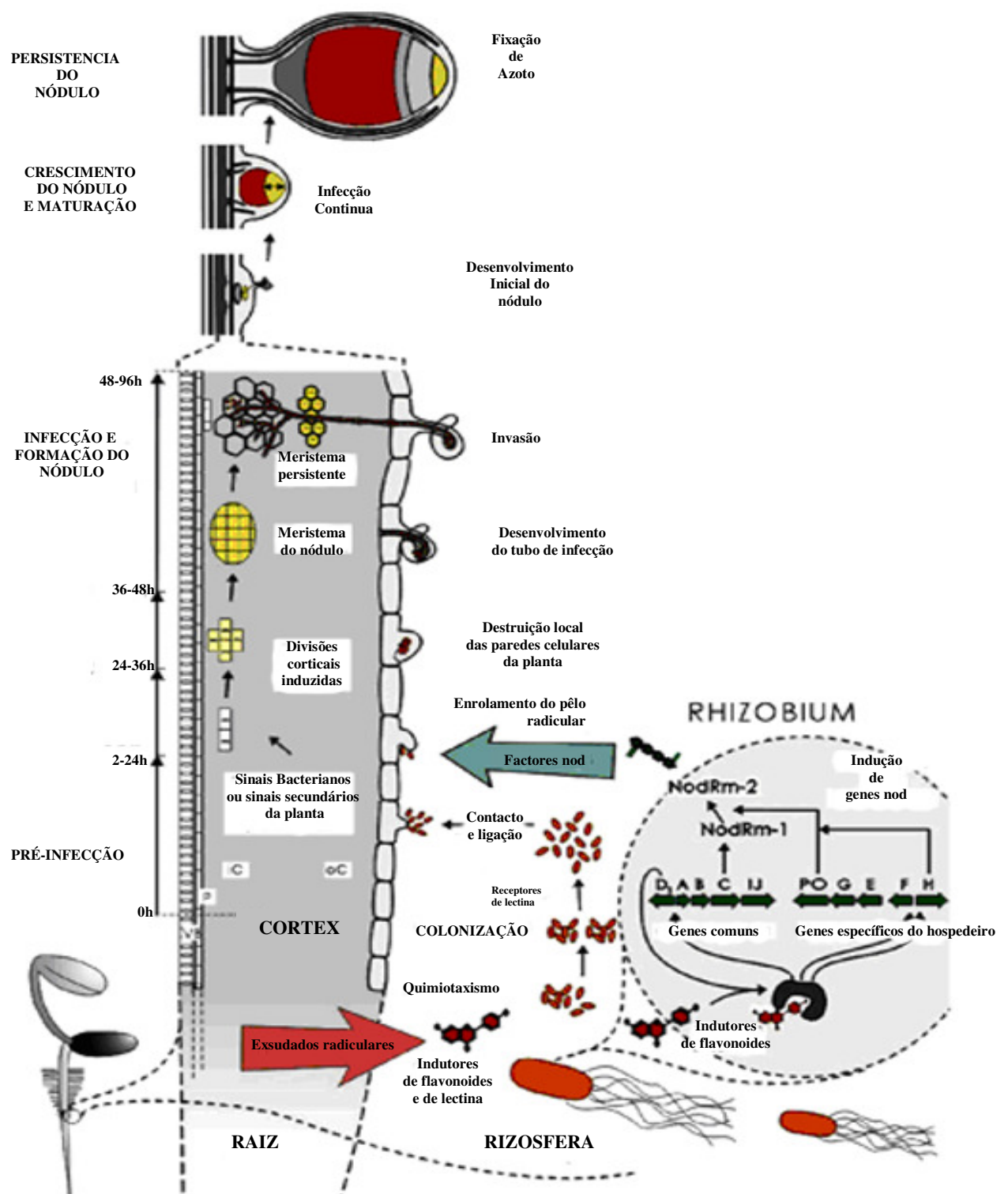


Figura 1: Estabelecimento da simbiose de *Sinorhizobium meliloti*-*Medicago sativa* (adaptado de Kapp, 1996)

1.4. Diversidade microbiana

A diversidade microbiana constitui um enorme recurso natural para a humanidade, sendo as comunidades do solo extremamente diversas, com estimativas da ordem de 13000 espécies por grama de solo (Torsvik *et al.*, 1990). A avaliação da diversidade genética e das relações genéticas entre estirpes de bactérias das populações naturais pode fornecer informações valiosas acerca dos genótipos que estão bem adaptados a certos ambientes. Correntemente os rizóbios estão divididos por cerca de 55 espécies pertencentes a 12 géneros (Weir, 2006; Sawada *et al.*, 2003), mas as plantas leguminosas compreendem cerca de 650 géneros e 18000 espécies, incluindo plantas anuais de vida curta e perene que se encontram distribuídas por uma ampla variedade de condições ecológicas (Doyle, 1994). As associações entre rizóbio e leguminosa são de enorme importância para a agricultura e ecologia e reflectem a associação simbiótica benéfica entre os dois simbiontes. Uma espécie de rizóbio apenas consegue nodular um pequeno número de espécies de leguminosas e talvez uma ou duas variedades de uma espécie eficientemente. No entanto, a grande maioria dos rizóbios estão ainda por identificar, devido principalmente à dificuldade do seu isolamento, identificação e especificidade de nodulação, deixando lugar para uma grande especulação acerca da real amplitude da diversidade do rizóbio.

1.4.1. Métodos moleculares utilizados em estudos de diversidade de rizóbio

Nas últimas duas décadas, vários marcadores genéticos baseados em DNA têm sido desenvolvidos para explorar a diversidade das populações de bactérias. Dois tipos de métodos de genotipagem que diferem de acordo com a informação que providenciam podem ser distinguidos. Primeiro, métodos de “fingerprinting” revelaram a existência de numerosos polimorfismos ao longo de todo o genoma. Eles incluem RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) (Williams *et al.*, 1990), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) (Vos *et al.*, 1995), e PFGE (Pulsed-Field Gel Electrophoresis) (Schwartz & Cantor, 1984). A principal limitação destas técnicas é a sua dificuldade de aceder aos eventos que causaram os polimorfismos observados (por exemplo, rearranjos genómicos, inserção/delecção ou mutações pontuais). Além disso, o RAPD é

normalmente considerado como sendo uma técnica fracamente reprodutível, enquanto que a PFGE consome muito tempo e é pouco prática para ser utilizada como técnica de rotina. Os métodos focados em determinados loci examinam variações alélicas após a amplificação de PCR de uma sequência específica de DNA. Estas técnicas providenciam informações acerca de variações pontuais como SNP (Single Nucleotide Polymorphism), que são de grande interesse em ecologia, em estudos evolucionários ou biogeográficos ([Brumfield *et al.*, 2003](#); [Morin *et al.*, 2004](#)).

Vários métodos alternativos têm sido desenvolvidos, como MLRT (Multilocus Restriction Typing) ([Coenye & LiPuma, 2002](#)) ou SSCP (Single Stranded Conformation Polymorphism) ([Sunnucks *et al.*, 2000](#)). No entanto, a avaliação genotípica é condicionada pela disponibilidade de enzimas de restrição ou posterior sequenciação e qualquer novo alelo pode não ser identificado devido às limitações de discriminação do método. A necessidade de um método alternativo que providencie informações sobre as sequências de DNA fiáveis e sensíveis em grande escala, levou ao desenvolvimento de métodos baseados em hibridações usando ácidos nucleicos imobilizados em superfícies sólidas e fixas. Assim, a tecnologia de *Microarray* de DNA permite a hibridação paralela de ácidos nucleicos de um grande número de fragmentos de DNA imobilizados numa pequena área de superfície, providenciando bons resultados e permitindo análises para uma grande variedade de aplicações ([Drmanac *et al.*, 2002](#); [Lockhart *et al.*, 1996](#); [Pease *et al.*, 1994](#); [Wang *et al.*, 1998](#)). Na tabela 1 encontram-se algumas das técnicas, anteriormente descritas e o seu potencial discriminante, para a classificação taxonómica.

Tabela 1: Fontes de informação taxonômica.

Componente da célula	Análise	Nível taxonômico		
		Gênero ou acima	Espécie	Subespécie ou estirpe
DNA Cromossomal	Composição base (mol.% G+C)	+	+	
	Hibridação DNA:DNA		+	+
	Padrões de restrição (RFLP, ribotipagem, etc)		+	+
Segmentos de DNA	Sondas de DNA	+	+	+
	Sequenciação de DNA	+	+	+
	PCR baseado em DNA		+	+
	“Fingerprinting” (PCR-RFLP, RAPD)			
DNA ribossomal	Hibridação DNA:rRNA	+	+	
	Sequências nucleotídicas	+	+	
Proteínas	Sequências de aminoácidos	+	+	
	Padrões de electroforese		+	+
	Electroforese enzimática multilocus			+
	Comparações serológicas	+	+	+
Marcadores químicos	Peptidoglicano	+		
	Ácidos gordos	+	+	
	Quinonas isoprénicas	+	+	
	Ácidos micólicos	+	+	
	Lípidos polares	+	+	
	Poliaminas	+		
	Polissacarídeos	+	+	
	Ácidos teicoicos	+	+	
Organismos inteiros	Pirólise de Espectrometria de massa		+	+
	Testes enzimáticos rápidos		+	+
Características expressadas	Morfologia	+	+	
	Fisiologia	+	+	

Abreviações: RFLP, restriction fragment length polymorphism; RAPD, randomly amplified polymorphic DNA fingerprints; PCR, polymerase chain reaction (Priest & Goodfellow, 2000).

No sentido de tentar conhecer a real diversidade dos rizóbios tem sido feito um progresso impressionante, particularmente na última década, com a aplicação de várias técnicas para análise de DNA. Alguns exemplos dessas técnicas muito úteis são a

amplificação de DNA de rizóbios com *primers* específicos como REP (Repetitive Extragenic Palindromic), ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus), BOX (enterobacterial repetitive sequences) (e.g. De Bruijn, 1992; Versalovic *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 2000; Ferreira & Hungria, 2002; Mostasso *et al.*, 2002; Grange & Hungria, 2004; Kaschuk *et al.*, 2005), a análise de genes ribossomais (16S e 23S rRNA) e de regiões intergênicas por RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) e a sequenciação de DNA (Laguerre *et al.*, 1996; Vinuesa *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2000; Bernal & Graham, 2001; Andrade *et al.*, 2002; Mostasso *et al.*, 2002; Grange & Hungria, 2004; Kaschuk *et al.*, 2005). No entanto, apesar destes avanços e do contínuo refinamento das técnicas moleculares, ainda restam algumas preocupações em relação a assuntos tão simples como o método usado para amostragem na avaliação da diversidade dos rizóbios.

1.5. Influência de diferentes factores ambientais na sobrevivência de rizóbio

Para poderem sobreviver às várias situações de stresse que encontram na natureza, as bactérias desenvolveram respostas rápidas que resultam na prevenção ou reparação de danos causados pelo stresse. Em adição a essas respostas específicas de cada tipo de stresse, respostas mais gerais são usadas em reacção a agressões tão diferentes como alta osmolaridade, altas e baixas temperaturas, variação de pH e falta de nutrientes. Uma consequência bem conhecida dessas respostas ao stresse é a capacidade das bactérias para resistirem melhor ao stresse em fase de crescimento estacionário do que na fase exponencial (Uhde *et al.*, 1997). Este fenómeno foi observado na maioria das espécies bacterianas estudadas até agora, sendo considerada uma maneira universal de sobrevivência não só aos vários stresses a que correntemente estão sujeitas, mas também a outros stresses que potencialmente podem vir a enfrentar no futuro. Sendo por isso de grande importância na natureza, onde as bactérias normalmente enfrentam condições de escassez de nutrientes e limitações de oxigénio e onde as condições ambientais estão constantemente em mudança (Hengge-Aronis, 2000).

Tanto em vida livre como em simbiose com a planta, os rizóbios estão sujeitos a vários stresses, como por exemplo, o stresse oxidativo durante a infecção do pêlo radicular e invasão do nódulo (Jamet *et al.*, 2003; Santos *et al.*, 2000; Santos *et al.*, 2001; Sigaud *et al.*, 1999). Também se encontram em stresse no nódulo, onde existe limitação de

oxigénio na zona fixadora de azoto (Soupéne *et al.*, 1995). Nos solos, entre os vários factores ambientais que podem afectar negativamente a capacidade de nodulação e de fixação de N₂ das populações indígenas de rizóbio estão: variações de temperatura, osmolaridade, pH, factores biológicos (por ex. competição por parte de rizóbios menos eficientes), salinidade, nitratos, pesticidas, herbicidas, metais pesados, escassez de nutrientes (Castro, 2000; Van Overbeek & Van Elsas, 1997; Van Veen *et al.*, 1997; Zahran, 1999). Estas situações de stresse, podem reduzir a sobrevivência, o crescimento e inibir a simbiose leguminosa-rizóbio (Dowling & Broughton, 1986; Triplett & Sadowsky, 1992; Zahran, 1999).

1.5.1. Temperatura

Temperaturas elevadas e escassez de água causam stresses elevados para as culturas de leguminosas em muitos lugares do mundo. Temperaturas elevadas nas raízes têm demonstrado afectar fortemente a infecção bacteriana e a fixação de N₂ em várias espécies de leguminosas (Munevar & Wollum, 1982; Possingham *et al.*, 1965; Frings, 1976; Arayankoon *et al.*, 1990; Kishinevsky *et al.*, 1992; Philpotts, 1967; Rainbird *et al.*, 1983; Hungria & Franco, 1993; Piha & Munns, 1987). A temperatura óptima descrita para a simbiose bactéria-leguminosa durante a formação de nódulos situa-se entre 25 e 33°C (Pankhurst & Sprent, 1976), apesar de se terem observado reduções na actividade de fixação de N₂ acima de 28°C (Hungria & Franco, 1993). A temperatura elevada pode afectar a fixação de N₂ directa ou indirectamente. A inibição directa pela temperatura é uma consequência da diminuição do desenvolvimento dos nódulos (Dart & Mercer, 1965; Piha & Munns, 1987), da sua funcionalidade (Piha & Munns, 1987; Hernández-Armenta *et al.*, 1989) e da aceleração da senescência dos nódulos. A inibição indirecta está relacionada com os efeitos da temperatura na formação da depressão do pêlo radicular, redução de locais de nodulação (Frings, 1976; Jones & Tisdale, 1921), e aderência modificada das bactérias aos pêlos radiculares (Frings, 1976), fornecimento de produtos fotossintéticos aos nódulos.

1.5.2. Salinidade

Por todo o globo existem regiões com condições de secura, por vezes associadas a solos com baixa capacidade de retenção de água, deficientes em minerais, entre outras. Nestas zonas, a introdução de estirpes de rizóbio bem adaptadas a sobreviver saprofiticamente poderá ser intrinsecamente importante tanto para sistemas de produção em regime de sequeiro, como para sistemas de irrigação sob risco de salinização.

A salinização é a acumulação de sais solúveis na água do solo a um nível que causa impacto na produção agrícola, saúde ambiental e bem-estar económico. Os solos afectados pelo sal ocorrem por todo o mundo, com uma variedade de proporções, natureza e propriedades. Nenhuma zona climática está livre do problema de salinização, embora normalmente se pense nas regiões áridas ou semiáridas como áreas preferencialmente afectadas. É um processo complexo envolvendo dinâmicas sazonais de sais, deslocação de água no perfil do solo e interacções hidrofílicas de água subterrânea. Os minerais trazidos pela chuva e pelo vento que são acumulados em depósitos minerais, constituem fontes de sais, que posteriormente são redistribuídos pelas águas superficiais e subterrâneas. Os sais de sódio dominam em muitos solos salinos do mundo. Mas sais de outros cationes como cálcio, magnésio e ferro são também encontrados em localizações específicas ([Rengasamy, 2005](#)).

Quase 40% da superfície terrestre mundial pode ser considerada como tendo um potencial problema de salinidade ([Cordovilla *et al.*, 1994](#)). Mais ainda, é esperado que a salinidade do solo aumente nas áreas cultivadas como resultado de uma acumulação local de sal devido a irrigações e aplicações de fertilizantes químicos ([Miller & Wood, 1996](#)). Este stresse ambiental é um dos mais limitantes à produtividade das culturas de leguminosas principalmente em regiões áridas e semiáridas, particularmente porque as leguminosas obtêm a maioria das suas necessidades de azoto através da fixação simbiótica ([El-Sheikh & Wood, 1995](#)).

Em leguminosas o stresse salino de 50 a 200 mM de NaCl também impõe uma limitação significativa de produtividade relacionada com o efeito adverso no crescimento da planta hospedeira, na nodulação ([Zahran, 1999](#)) e na capacidade de fixação de azoto ([Bekki *et al.*, 1987](#); [Zahran & Sprent, 1986](#)), resultando em baixa produtividade das leguminosas ([Miller & Wood, 1996](#), [Delgado *et al.*, 1993](#); [Georgiev & Atkias, 1993](#)). O

aumento de concentração salina ou o aumento das condições de seca fazem diminuir a permeabilidade dos nódulos (Drevon *et al.*, 1994; González *et al.*, 2001; Serraj *et al.*, 1999; Sprent, 1972; Vance & Heichel, 1991).

O crescimento da maioria das estirpes rizobianas é inibido a concentrações de 100 mM de NaCl, enquanto algumas estirpes podem tolerar concentrações de 300 mM (Embalomatis *et al.*, 1994; Mohammed *et al.*, 1991; Muller & Pereira, 1995) ou mesmo 1 M de NaCl (Pereira *et al.*, 2007). O stresse salino também acelera a redução do conteúdo de leghemoglobina dentro dos nódulos e a passagem a nódulos verdes, o que origina nódulos ineficazes (Delgado *et al.*, 1993).

Assim, a sobrevivência e o crescimento da planta em solos salinos resulta do desenvolvimento de processos adaptativos, como transporte de iões e compartimentação, síntese e acumulação de solutos osmóticos, o que leva a um ajustamento do equilíbrio osmótico e à activação de proteínas para reparação celular (Rai *et al.*, 1985).

Várias substâncias químicas são conhecidas por serem acumuladas por microrganismos e plantas como protecção ao stresse salino, incluindo poliaminas (Aziz *et al.*, 1999, Kasinathan & Wingler, 2004), aminoácidos, como por exemplo prolina, serina e glutamina (TeChien *et al.*, 1992; Sairan & Tyagi, 2004; Soussi *et al.*, 1998), açúcares solúveis (Hu & Schmidhalter, 2004; Sairan & Tyagi, 2004) e catiões inorgânicos como o K^+ (Asch *et al.*, 1999; Sairan & Tyagi, 2004).

1.6. Objectivos

O principal objectivo deste trabalho foi a caracterização de estirpes pertencentes a uma população de *Sinorhizobium* isolada dum solo do Alentejo (Elvas) com a finalidade de avaliar a sua diversidade genética, as propriedades fenotípicas, a capacidade de fixação de azoto, em simbiose com *Medicago polymorpha* e com diferentes cultivares de *Medicago sativa*.

Com o recurso a métodos moleculares fez-se também a identificação das estirpes de *Sinorhizobium* a nível da espécie. O estudo da tolerância a condições de stresse ambiental como temperatura e salinidade elevadas, também constituiu um objectivo deste trabalho, tendo como finalidade a posterior utilização de estirpes no aumento da produção forrageira.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. MATERIAIS

2.1.1. Material biológico

Utilizaram-se 107 estirpes de *Sinorhizobium spp.* Isoladas dos nódulos radiculares, originários de 5 cultivares de *Medicago sativa*, designadamente, 21 estirpes da cultivar ABT, 20 estirpes da cultivar Magali, 23 estirpes de Mamuntanas, 25 estirpes de Melissa e 18 estirpes da cultivar Coussouls.

2.1.2. Meios de cultura

Os meios de cultura, após preparação foram esterilizados por autoclave a 120°C durante 15 minutos.

- Meio de agar de **manitol-levedura** (AML) utilizado para o isolamento, manutenção e conservação das estirpes de *Sinorhizobium* (Vincent, 1970).

Composição por litro:

K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g
NaCl	0,1 g
Manitol	10 g
Extracto de levedura	0,4 g
Agar	15 g
pH	7,0

- Meio **AML com Vermelho de Congo** (VC):

AML	150 ml
VC (solução stock)	1,5 ml

- Solução stock de Vermelho de Congo (VC) (0,25%):

Vermelho de Congo	0,25 g
-------------------	--------

Água destilada	100 ml
----------------	--------

Esteriliza-se em autoclave a 120°C, durante 15 minutos.

- Meio AML com Azul de Bromotimol (BTB), composição por litro:

AML	1000 ml
-----	---------

BTB (solução stock)	5 ml
---------------------	------

pH	6,8
----	-----

- Solução stock de Azul de Bromotimol (BTB):

Azul de bromotimol	0,5 g
--------------------	-------

Etanol	100 ml
--------	--------

- Meio de Agar- água, composição por litro:

Agar	15 g
------	------

- Meio de triptona-levedura (TY) ([Beringer & Hirsch, 1984](#)), utilizado para a cultura das estirpes de *Sinorhizobium*. Composição por litro:

Triptona	5 g
----------	-----

Extracto de levedura	3 g
----------------------	-----

CaCl ₂ .2H ₂ O	0,8807 g
--------------------------------------	----------

Agar	15 g
------	------

- Meio de triptona-levedura liquido (TY liquido) tem igual composição mas sem adição de agar.

- Meio de **Jensen** (Jensen, 1942), utilizado como solução nutritiva para o crescimento de plantas. Composição por litro:

CaHPO ₄	1 g
K ₂ HPO ₄	0,2 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g
NaCl	0,2 g
FeCl ₃	0,1 g
Agar	13 g
Solução de micronutrientes	1 ml
pH	6,8

- Composição da solução de micronutrientes, por litro:

H ₃ BO ₃	2,8 g
MnSO ₄ .H ₂ O	1,39 g
ZnCl ₂	0,1 g
MoO ₃	0,071 g
CuSO ₄ .3H ₂ O	0,078 g

2.1.3. Tampões

Utilizados na realização de electroforeses.

- **TBE (10x concentrado)**, composição por litro:

Tris	108 g
Ácido Bórico	55 g
EDTA sódico	9,3 g
pH	8,3

A composição por litro, utilizada é diluída 10x em água destilada.

2.1.4. Agaroses

Utilizadas como constituinte dos géis de electroforese.

➤ **Agarose a 1 %**

Agarose (Sigma –Type II)	3 g
TBE diluído 10x	300 ml
Derrete-se no microondas	

➤ **Agarose a 3 %**

Agarose (Sigma –Type II)	9 g
TBE diluído 10x	300 ml
Derrete-se no microondas	

2.2. MÉTODOS

2.2.1. Isolamento de bactérias

As bactérias de *Sinorhizobium sp.* utilizadas tinham sido previamente isoladas de nódulos de 5 cultivares de *Medicago sativa* (luzerna perene) crescidas em solos colhidos no Alentejo, em Elvas (ENMP) e encontravam-se armazenadas a 4°C em frascos de AML com carbonato de cálcio. Foram efectuados os reisolamentos destas culturas através de riscado por exaustão (Somasegaran & Hoben, 1994) em placas de AML com Vermelho de Congo (VC) e incubadas durante 3 dias a 28°C. O VC permite distinguir facilmente eventuais organismos contaminantes. A pureza das culturas foi confirmada 3 vezes. Sempre que numa cultura se tenha verificado a existência de colónias com aspecto diferente (forma e cor), procedeu-se separadamente ao isolamento destas colónias para novas placas de AML com VC, dando origem a isolados com o mesmo número mas diferentes letras (a, b, c e d), sendo por fim repicadas para frascos com meio AML e conservadas a 4°C.

Procedeu-se também ao isolamento de *Sinorhizobium* de alguns nódulos após os testes de nodulação do hospedeiro. Para a realização destes testes utilizaram-se plantas de *Medicago sativa* das cultivares ABT, Coussouls, Mamuntanas, Melissa e Magali.

Os nódulos radiculares de *M. sativa* foram destacados e posteriormente imersos em álcool etílico, a 95%, durante 12 segundos com agitação vigorosa. Após remoção do álcool passou-se por uma solução de HgCl₂ agitando-se durante 1 minuto. Depois de se remover esta solução, os nódulos foram lavados 5 vezes com água destilada estéril, e depois esmagados. Em seguida, fez-se um riscado em placas de AML com VC e incubaram-se as placas durante 3 a 5 dias neste meio diferencial, a 28°C e em condições de escuridão e procedeu-se como anteriormente.

2.2.2. Caracterização das colónias em Vermelho de Congo

A caracterização de colónias em placas de AML com Vermelho de Congo(VC) (descrito em 2.1.2) é um processo rotineiro que permite diferenciar colónias de rizóbios. Os rizóbios, quando incubados no escuro, formam geralmente colónias brancas ou absorvem fracamente o VC (Bloem *et al.*, 2002), existindo no entanto excepções, como por exemplo algumas estirpes de *Sinorhizobium* que absorvem VC fortemente (Somasegaran & Hoben, 1994). As placas foram incubadas a 28°C no escuro, e observadas ao 3º dia, procedendo-se à separação de colónias que se suspeite serem rizóbio mas com aspecto diferente para novas placas de AML com VC, repetindo-se este procedimento três vezes, até se obterem colónias com aspecto uniforme. As colónias isoladas foram armazenadas inoculando frascos com AML, posteriormente guardados a 4°C.

2.2.3. Caracterização em Azul de Bromotimol

As estirpes de *Sinorhizobium* foram avaliadas quanto ao tipo de reacção que se observa quando crescem em placas de AML com BTB como indicador, apresentando este meio uma cor esverdeada. De cada uma das estirpes mantidas a 4°C em AML, procedeu-se a repicagens para placas de AML com BTB (1 ou 2 estirpes/placa). As placas foram incubadas a 28°C e observadas durante 3 dias. Os rizóbios de crescimento lento alcalinizam o meio, apresentando este a cor final azul, enquanto que os rizóbios de crescimento rápido acidificam o meio, ficando o meio de cor amarela (Somasegaran & Hoben, 1994).

2.2.4. Germinação de sementes

As sementes de *Medicago* foram desinfectadas superficialmente do seguinte modo:

- (1) Imersão durante 10 segundos, com agitação, em álcool etílico (98%);
- (2) Imersão durante 1 minuto, com agitação, em solução de HgCl₂ a 0.1%;
- (3) 4 Passagens sucessivas em água destilada esterilizada com agitação durante 1 minuto cada.

Para a germinação, as sementes foram posteriormente espalhadas em placas de Petri contendo agar de água. As placas foram colocadas invertidas na estufa a 28°C durante 1 ou 2 dias.

2.2.5. Avaliação da eficiência simbiótica

A eficiência da simbiose foi avaliada pela comparação do peso seco da parte aérea das plantas de luzerna inoculadas com cada uma das estirpes e as plantas controlo (isto é não inoculadas). Para estes ensaios as estirpes foram inoculadas nas respectivas cultivares de *M. sativa* (luzerna perene) de origem. Todas as estirpes, excepto uma foram também inoculadas em plantas de *Medicago polymorpha* (luzerna anual). As plantas cresceram sob condições assépticas, em frascos estéreis contendo 8 ml de meio de Jensen (descrito em 2.1.2) solidificado em cunha e cobertos com papel celofane com um orifício tapado com algodão. Colocou-se em cada frasco uma semente pré-germinada (descrito em 2.2.4) no centro do meio inclinado, que foi posteriormente inoculado com 1 ml de cada um dos isolados previamente crescidos em meio de AML e ressuspensos em 5ml de água destilada estéril. Fizeram-se 3 réplicas por isolado, 6 réplicas de controlos com azoto (TN), aos quais se adicionou 1 ml de solução azotada (KNO₃) após 1 semana de crescimento, e 6 réplicas de controlo negativo (T0), isto é, sem inoculação ou adição de azoto. As plantas foram colocadas a crescer em câmara com fotoperíodo controlado (12 horas) e temperaturas diurnas de 23°C e nocturnas de 18°C. Após 6 semanas de crescimento as plantas foram retiradas. Anotou-se a presença ou ausência de nódulos, bem como a cor dos nódulos. A parte aérea foi destacada, colocada a secar 48 horas em estufa a 60 °C e o seu peso determinado.

Calculou-se a média de pesos secos das plantas controle (TN e T0) e das plantas inoculadas com cada uma das estirpes, considerando-se nestas últimas apenas as plantas noduladas. Para se obter a eficiência simbiótica relativa (ESR), utilizaram-se as médias de pesos secos (PS) por estirpe e calculou-se a sua percentagem em relação ao controle com azoto (TN), segundo a seguinte equação: $ESR = [(PS - T0) \times 100] / (TN - T0)$ (Maâtallah *et al.*, 2002).

2.2.6. Ensaios de tolerância

2.2.6.1. Temperatura

As culturas de *Sinorhizobium*, mantidas a 4°C em meio de AML, foram repicadas para placas contendo TY, e incubadas durante 3 dias a 28°C, a partir dos quais se inocularam para tubos, contendo 5 ml de meio TY líquido, agitando-se vigorosamente. Utilizaram-se 2 réplicas por estirpe. Os tubos foram fechados com tampas seladas com parafilme e após as leituras das respectivas densidades ópticas a 600 nm (DO₆₀₀), foram incubados com agitação (cerca de 100 rpm) a diferentes temperaturas (28°C, 32°C, 36°C, 40°C e 42°C). Utilizaram-se 2 réplicas por estirpe e por temperatura. O ensaio decorreu durante 6 dias e as leituras da DO₆₀₀ foram realizadas diariamente durante os primeiros 3 dias e no último dia.

2.2.6.2. Salinidade

Fez-se uma solução-mãe de NaCl com concentração 1 M em meio TY líquido, a partir da qual foram feitas as diluições com meio TY líquido ajustando-se às concentrações de 20 mM, 100 mM e 500 mM. Em seguida as soluções foram esterilizadas em autoclave (15 minutos a 120°C).

As estirpes foram colocadas a crescer como descrito anteriormente, a partir das quais se inocularam para tubos contendo TY líquido com as diferentes concentrações. Utilizaram-se 2 réplicas por estirpe e por concentração, de NaCl: 0 mM, 20 mM, 100 mM, 500 mM e 1 M. Os tubos foram fechados com tampas seladas com parafilme e

colocados a crescer a 28°C. O ensaio decorreu durante 6 dias e as leituras da DO₆₀₀ foram realizadas diariamente durante os primeiros 3 dias e no último dia.

2.2.7. Caracterização molecular das estirpes de *Sinorhizobium* sp.

2.2.7.1. Extracção de DNA genómico

As estirpes foram colocadas a crescer em placas de meio TY sólido, durante 3 dias a 28°C, de cada uma das culturas inocularam-se tubos contendo 5ml de meio TY líquido. Os tubos foram incubados durante aproximadamente 24h com agitação de 100 rpm, até se atingir a fase exponencial de crescimento das bactérias, que foi confirmada através das leituras das respectivas densidades ópticas (DO₆₀₀), tendo por base que a DO₆₀₀=1 corresponde a 10⁷ -10⁸ bactérias/ml (Gonçalves & Castro, 2004). Em seguida procedeu-se à extracção de DNA das amostras, segundo as instruções do fabricante do “Kit de extracção da Nucleospin” utilizado, como se descreve:

Transferiu-se 1,5 ml de cada uma das culturas de *Rhizobium* a testar para tubos de “eppendorf “ e seguiram-se os seguintes passos:

- Centrifugação das amostras a 4°C, durante 10 minutos, a 8000 rpm;
- Retirou-se o sobrenadante, e adicionou-se ao *pellet* 180µl de tampão T1 pipetando várias vezes;
- Adicionou-se 25 µl de proteinase K, e em seguida agitou-se vigorosamente;
- Incubou-se as amostras a 56°C em banho de água durante cerca de 3h;
- Adicionou-se 200 µl de solução B3, agitou-se vigorosamente, e colocou-se em banho de água a 70°C durante 10 minutos;
- Adicionou-se 210 µl de etanol (99,8%) às amostras e agitou-se imediatamente;
- Para cada amostra, colocou-se uma coluna “NucleoSpin” em tubos de colheita de 2 ml, e aplicou-se a amostra na coluna. Centrifugou-se durante 1 minuto a 10000 rpm. Descartou-se o líquido do tubo e colocou-se a coluna de novo no tubo colector;
- Sempre que a amostra não passou pela coluna, repetiu-se esta centrifugação;
- Para lavar a membrana de sílica da coluna adicionou-se 600 µl de tampão B5, e agitou-se durante 1 minuto a 11000 rpm (em alguns casos à velocidade máxima

de 14000 rpm para permitir a passagem de todo o tampão pela coluna) e descartou-se o eluído. Este passo foi repetido;

- Em seguida centrifugou-se durante 2-3 minutos a 14000 rpm, para remover completamente o tampão B5;
- Colocou-se a coluna “Nucleospin” num novo tubo “eppendorf” de 1,5 ml e adicionou-se 100 µl de tampão de eluição BE às colunas e incubou-se a 70°C durante 2 minutos em banho de água;
- Finalmente centrifugou-se durante 1 minuto a 14000 rpm.

Removeram-se as colunas, e as amostras de DNA recolhidas nos “eppendorf” foram guardadas a 4°C.

Posteriormente todas as amostras de DNA foram visualizadas por electroforese em gel de agarose 1%.

2.2.7.2. Fundamentos da técnica de PCR

A técnica de PCR (*polymerase chain reaction* – reacção em cadeia pela polimerase) baseia-se no processo de replicação de DNA que ocorre *in vivo*. Durante esta reacção são usadas temperaturas elevadas de forma a separar as moléculas de DNA em duas cadeias simples, permitindo então a ligação de oligonucleótidos iniciadores (*primers*), também em cadeia simples e geralmente constituídos por 15 a 30 nucleótidos, obtidos por síntese química. Para amplificar uma determinada região são necessários dois iniciadores complementares das sequências que flanqueiam o fragmento de DNA a amplificar, nos seus terminais 3', de modo a permitir a actuação da DNA polimerase durante a síntese da cadeia complementar, usando como molde cada uma das duas cadeias simples constituintes do DNA a amplificar (Figura 2).

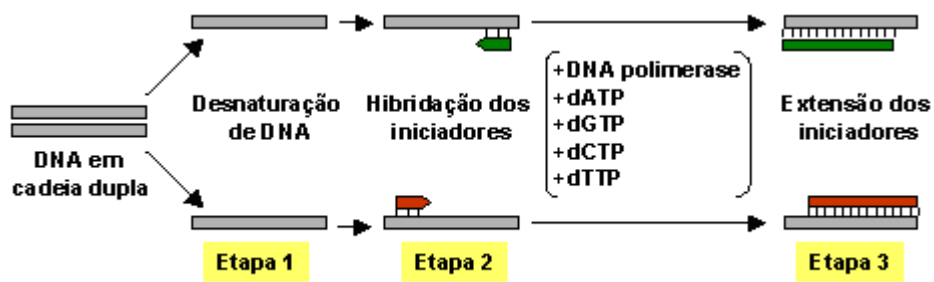


Figura 2: Iniciação da amplificação de DNA.

Para realizar o PCR são necessárias pequenas quantidades do DNA alvo, um tampão salino contendo a polimerase, oligonucleotídeos iniciadores, os quatro desoxinucleotídeos constituintes do DNA e o cofactor Mg^{2+} . Esta mistura é submetida a vários ciclos de amplificação que consistem em:

- Desnaturação do DNA pelo calor, de modo a separar as duas cadeias;
- Associação dos iniciadores por ligações de hidrogénio ao DNA em cadeia simples. Para permitir essa associação a mistura de reacção é arrefecida;
- Extensão dos iniciadores através da síntese da cadeia complementar de cada cadeia molde, catalisada pela DNA polimerase;

O processo envolvendo estes três passos, pode ser repetido várias vezes (25 a 30 ciclos) sendo possível aumentar, em cada ciclo, duas vezes a concentração de DNA pré-existente (

Figura 3). Em teoria, se for possível levar a cabo 25 ciclos de amplificação seguidos, a concentração de DNA aumentaria 2^{25} vezes embora, na prática, devido a alguma ineficiência no processo de amplificação, esse aumento fique por um milhão de vezes.

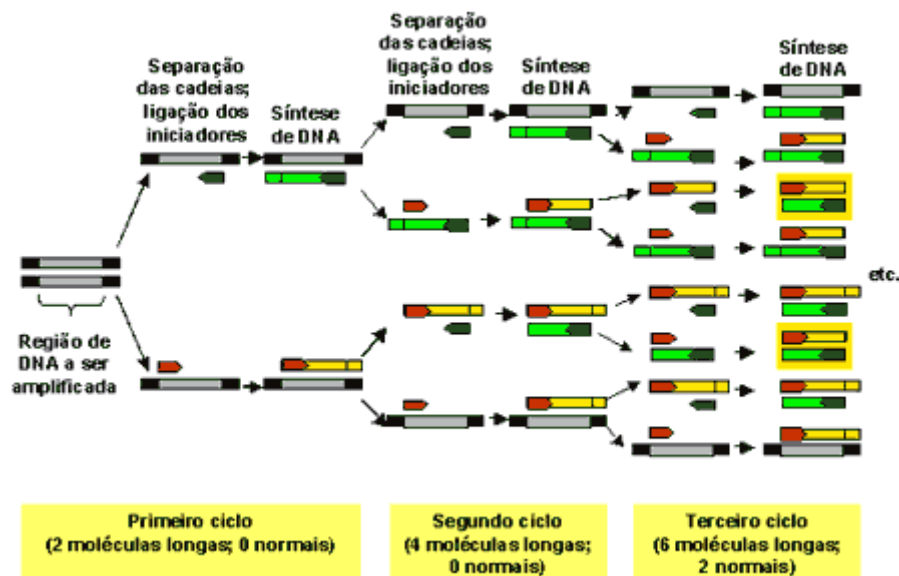


Figura 3: Esquema representativo da amplificação de DNA por PCR.

Como na técnica de PCR se encontram envolvidos vários ciclos de amplificação, utiliza-se equipamento que permite programar, de forma contínua e automatizada, os vários ciclos de aquecimento e arrefecimento. Para tal ser concretizável, as DNA polimerases utilizadas deverão ser termoestáveis, utilizando-se por isso a DNA polimerase da estirpe termofílica *Thermus aquaticus* (Taq DNA polimerase) que actua a temperaturas elevadas levando assim a um aumento da especificidade da reacção. De referir ainda que os produtos amplificados podem ser visualizados após [electroforese em gel de agarose](#) e os seus tamanhos estimados por comparação com os pesos moleculares das bandas dos marcadores de DNA utilizados (Griffiths *et al.*, 2002; Purves *et al.*, 2000).

2.2.7.3. Análise de DNA genómico por REP-PCR e ERIC-PCR

Como foi referido na alínea anterior, na técnica de PCR, realiza-se a amplificação de sequências de DNA *in vivo*. Para podermos aplicar a técnica de PCR, para além da polimerase, os quatro desoxinucleótidos constituintes do DNA e o cofactor Mg^{2+} , são necessários *primers* iniciadores da reacção complementares a uma determinada sequência conhecida de DNA. O conhecimento de sequências curtas intergénicas altamente conservadas encontradas em um grande número de bactérias entéricas gram-negativas, veio simplificar o desenho de *primers* para reacções de PCR, dando origem a técnicas, como REP (Repetitive Extragenic Palindromic)-PCR e ERIC (Enterobacterial

Repetitive Intergenic Consensus)-PCR, que utilizam como *primers* as seguintes sequências nucleotídicas conservadas (De Bruijn, 1992):

❑ **REP-PCR**

■ REP1R: 3'-CGGICTACIGCIGCIIII-5'

■ REP2: 5'-ICGICTTATCIGGCCTAC-3'

❑ **ERIC-PCR**

■ ERIC1R: 3'-CACTTAGGGGTCCTCGAATGTA-5'

■ ERIC2: 5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'

Após a extração de DNA das estirpes de *Sinorhizobium* procedeu-se à amplificação de cada uma das amostras com os *primers* REP1R e REP2, constituindo a reacção REP-PCR e também com os *primers* ERIC1R e ERIC2, constituindo a reacção ERIC-PCR. A conjugação de conhecimentos obtidos por duas técnicas que utilizam duas sequências não homólogas (REP e ERIC) de DNA, permite amplificar regiões diferentes do genoma resultando numa melhor separação entre estirpes devido à obtenção de um maior número de amplificações ou seja bandas no gel. Quanto maior a diferença entre as sequências e número de bandas no gel, maior a probabilidade das estirpes serem diferentes apesar de poderem ser da mesma espécie.

Nas reacções de PCR utilizou-se o Kit-Mix Quiagen (com cloreto de magnésio) e foram realizadas num Termociclador (Mastercycler Gradient marca Eppendorf) para um volume total de 20 µl. Assim para cada amostra utilizaram-se os seguintes volumes de cada um dos reagentes:

- 15,8 µl de Mix (Kit-Mix Quiagen), constituído por:
 - Taq Polimerase
 - 1,5 mM MgCl₂
 - 200 µM de cada dNTP
- 1 µl Primer 1 (REP1R/ERIC1R) (MWG Biotech AG – 10 pmol/µl)
- 1 µl Primer 2 (REP2/ERIC2) (MWG Biotech AG – 10 pmol/µl)
- 1 µl DMSO (Sigma – 100%)
- 0,2 µl BSA (Sigma – 20 mg/ml)
- No final, 1 µl de amostra de DNA.

Para minimizar os erros de pipetagem todos os reagentes, à excepção do DNA, foram colocados proporcionalmente ao número de amostras a tratar (no caso de termos 20 amostras mais dois controlos, multiplicam-se os volumes por 22), num tubo eppendorf designado por “MIX”.

As temperaturas utilizadas para as reacções de REP-PCR e ERIC-PCR (Caetano-Anollés & Gresshoff, 1997) encontram-se descritas nas Tabela 2 e Tabela 3.

Tabela 2: Temperaturas utilizadas na reacção de REP-PCR. (Caetano-Anollés & Gresshoff, 1997)

Passo	Tempo	Temperatura (°C)
1	2 minutos	95
2	30 segundos	94
3	1 minutos	40
4	8 minutos	65
5	Repetição dos passos 2 a 4 durante 35 ciclos	
6	8 minutos	65
7	Armazena a 4°C	

Tabela 3: Temperaturas utilizadas na reacção de ERIC-PCR. (Caetano-Anollés, 1997)

Passo	Tempo	Temperatura (°C)
1	2 minutos	95
2	30 segundos	94
3	1 minutos	50
4	8 minutos	65
5	Repetição dos passos 2 a 4 durante 30 ciclos	
6	8 minutos	65
7	Armazena a 4°C	

No gel de agarose (1%) foram colocados 10 µl de cada um dos produtos amplificados e 3 µl de tampão de ressuspensão (EDTA, glicerol, xilenicianol e azul de bromofenol). O marcador utilizado foi GeneRuler 1kb DNA Ladder (MBI Fermentas) com pesos moleculares entre 10000 e 250 pb. As electroforeses decorreram durante 4h, tendo corrido inicialmente a 70 Volts durante 30 minutos e o restante tempo a 80 Volts.

Os resultados de REP-PCR e ERIC PCR de PCR foram analisados a partir dos dados referentes à presença/ ausência de fragmentos amplificáveis, nos géis sob a forma de bandas, pelos programas Freetree e TreeView X, utilizando-se o coeficiente de Dice e o método UPGMA (‘Unweighted Pair Group Arithmetic Average’). Os resultados são

apresentados em dendogramas de forma a ilustrarem as relações genéticas dos isolados. Para a formação dos agrupamentos (*clusters*) considerou-se 70-80% de semelhança.

2.2.7.4. Amplificação do 16S-rDNA

A amplificação de sequências do gene 16S-rDNA é uma ferramenta no estudo das relações filogenéticas e evolucionárias entre bactérias, arqueões e organismos eucarióticos. Através da utilização de *primers* específicos para bactérias previamente descritos por Weisburg *et al.* (1990), pode-se obter a confirmação, através da presença de uma banda de cerca de 1500 pb num gel de electroforese, de que as estirpes obtidas se encontram entre as Eubacteria.

□ 16S-rDNA (Weisburg *et al.*, 1990)

■ fD1: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'

■ rD1: 5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3'

Nas reacções de PCR utilizou-se o Kit-Mix Quiagen (com cloreto de magnésio) e foram realizadas num Termociclador (Mastercycler Gradient marca Eppendorf) para um volume total de 20 µl. Assim para cada amostra (constituída pelo DNA extraído das diferentes estirpes de *Sinorhizobium*) utilizaram-se os seguintes volumes de cada um dos reagentes:

- 15,8 µl de Mix (Kit-Mix Quiagen), constituído por:
 - Taq Polimerase
 - 1,5 mM MgCl₂
 - 200 µM de cada dNTP
- 1 µl Primer 1 (fD1) (MWG Biotech AG – 10 pmol/µl)
- 1 µl Primer 2 (rD1) (MWG Biotech AG – 10 pmol/µl)
- 1 µl DMSO (Sigma – 100%)
- 0,2 µl BSA (Sigma – 20 mg/ml)
- No final, 1 µl de amostra de DNA.

Todos os reagentes à excepção do DNA foram colocados proporcionalmente ao número de amostras a tratar, num tubo eppendorf designado por “MIX”. As temperaturas utilizadas para a reacção de 16S rDNA-PCR. (Weisburg *et al.*, 1991), encontram-se descritas na Tabela 4.

Tabela 4: Temperaturas utilizadas na reacção de 16S rDNA-PCR. (Weisburg *et al.*, 1991)

Passo	Tempo	Temperatura (°C)
1	3 minutos	95
2	1 minutos	94
3	1 minutos	55
4	2 minutos	72
5	Repetição dos passos 2 a 4 durante 35 ciclos	
6	3 minutos	72
7	Armazena a 4°C	

2.2.7.4.1. Utilização da enzima *RsaI*

Utilizaram-se os produtos amplificados de 16S rDNA, descrito anteriormente, correspondentes às diferentes estirpes de *Sinorhizobium*. Em seguida procedeu-se à digestão enzimática dos produtos amplificados com a utilização da enzima de restrição *RsaI* conforme descrito por Zibri *et al.*, 2005. Segundo estes autores esta enzima é suficiente para permitir a separação entre as duas espécies de *Sinorhizobium*, *S. meliloti* e *S. medicae*, através da observação directa dos perfis de restrição obtidos após electroforese (Figura 4).

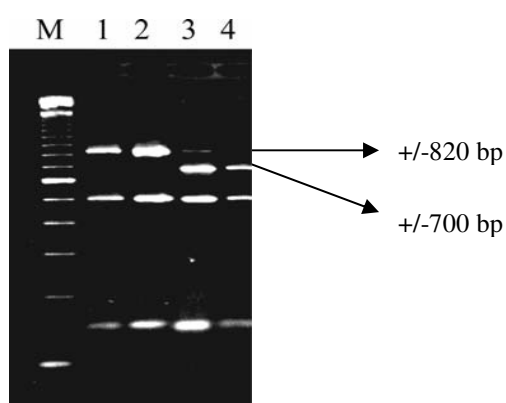


Figura 4: PCR/RFLP de 16S rDNA, perfis de restrição de *RsaI*, lanes 1- 2: *S. meliloti*; lanes 3- 4: *S. medicae*; lane M: marcador de DNA de 100pb. (Adaptado de Zibri *et al.*, 2005)

Após a obtenção do produto de PCR de 16S rDNA aplicou-se o seguinte produto de reacção contendo:

- 1 µl de Enzima (20U/ µl)
- 2 µl de Tampão (fornecido com a enzima)
- 10 µl de Amostra (16S rDNA PCR)
- 7 µl H₂O (estéril)

A mistura de reacção foi colocada durante 2h30m a 37°C. Posteriormente procedeu-se à corrida em gel de Agarose 3%, tendo as electroforeses decorrido durante 3h, inicialmente a 70 Volts durante 30 minutos e o restante tempo a 80 Volts.

2.2.7.5. Amplificação do gene nodC

O DNA extraído das amostras de *Sinorhizobium* foi igualmente utilizado nas reacções de amplificação do gene nodC. A sequência de nodC é relativamente longa, o que permite a amplificação de PCR de fragmentos de DNA de grandes dimensões, permitindo a obtenção de bandas bem visíveis num gel de electroforese. A banda esperada encontra-se aproximadamente nos 930 bp, os *primers* utilizados foram os seguintes:

□ NodC (Laguerre *et al.*, 2001)

- nodCFn: 5'-AGGTGGTYGAYGACGGTTC-3'
- nodCI: 5'-CGYGACAGCCANTCKCTATTG-3'

Nas reacções de PCR utilizou-se o Kit-Mix Quiagen (com cloreto de magnésio) e foram realizadas num Termociclador (Mastercycler Gradient marca Eppendorf) para um volume total de 20 µl. Assim para cada amostra utilizaram-se os seguintes volumes de cada um dos reagentes:

- 15,8 µl de Mix (Kit-Mix Quiagen), constituído por:
 - Taq Polimerase
 - 1,5 mM MgCl₂
 - 200 µM de cada dNTP

- 1 µl Primer 1 (nodCFn) (MWG Biotech AG – 10 pmol/µl)
- 1 µl Primer 2 (nodCI) (MWG Biotech AG – 10 pmol/µl)
- 1 µl DMSO (Sigma – 100%)
- 0,2 µl BSA (Sigma – 20 mg/ml)
- No final, 1 µl de amostra de DNA.

Para minimizar os erros de pipetagem todos os reagentes à excepção do DNA foram colocados proporcionalmente ao número de amostras a tratar, num tubo eppendorf designado por “MIX”. As temperaturas utilizadas para a reacção de PCR. (Laguerre *et al.*, 1994), encontram-se descritas na Tabela 5.

Tabela 5: Temperaturas utilizadas na reacção de nodC-PCR. (Laguerre *et al.*, 1994)

Passo	Tempo	Temperatura (°C)
1	3 minutos	95
2	1 minutos	94
3	1 minutos	55
4	2 minutos	72
5	Repetição dos passos 2 a 4 durante 35 ciclos	
6	3 minutos	72
7	Armazena a 4°C	

No gel de agarose (1%) foram colocados 10 µl de cada um dos produtos amplificados e 3 µl de tampão de ressuspensão (EDTA, glicerol, xilenocianol e azul de bromofenol). O marcador utilizado foi GeneRuler 1kb DNA Ladder (MBI Fermentas) com pesos moleculares entre 10000 e 250. As electroforeses decorreram durante 4h, tendo corrido inicialmente a 70 Volts durante 30 minutos e o restante tempo a 80 Volts.

2.2.7.6. Coloração de géis

Após as electroforeses, os géis foram colocados em imersão numa solução de brometo de etídio (2,0 µl.ml⁻¹) durante 15 minutos e as bandas coradas foram visualizadas num transiluminador de luz ultravioleta a 312 nm, que faz parte do equipamento GEL DOC XR da BIORAD.

Para o tratamento das imagens de electroforese, utilizou-se o programa QuantityOne 4.6.0 (1-D analysis da Bio Rad).

2.2.7.7. Análise de resultados

O cálculo das massas moleculares das bandas obtidas foram estimadas por comparação com o marcador de pesos moleculares de 1Kb (MBI-Fermentas), tendo-se utilizado o programa QuantityOne 4.6.0 (1-D analysis da Bio Rad).

Tabela 6: Pesos moleculares do marcador de 1Kb.

Banda nº	Massas moleculares (Kb)
1	10000
2	8000
3	6000
4	5000
5	4000
6	3500
7	3000
8	2500
9	2000
10	1500
11	1000
12	750
13	500
14	250

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Caracterização morfológica dos isolados de *Sinorhizobium*

3.1.1. Caracterização das colónias em Vermelho de Congo

Os isolados de *Sinorhizobium* quando crescidos em meio de AML com VC apresentavam crescimentos, ao fim de 3 a 5 dias, com diferentes absorções do corante (Figura 5 A, B, C e D), desde colónias, posteriormente identificadas como *S. meliloti* que não absorveram o Vermelho de Congo (Figura 5A), a colónias identificadas como *S. medicae* que absorveram o corante ligeiramente (Figura 5B) ou fortemente (Figura 5C). A grande variabilidade de formas e de cor das colónias facilitou e permitiu uma boa separação entre estirpes (Figura 5D).

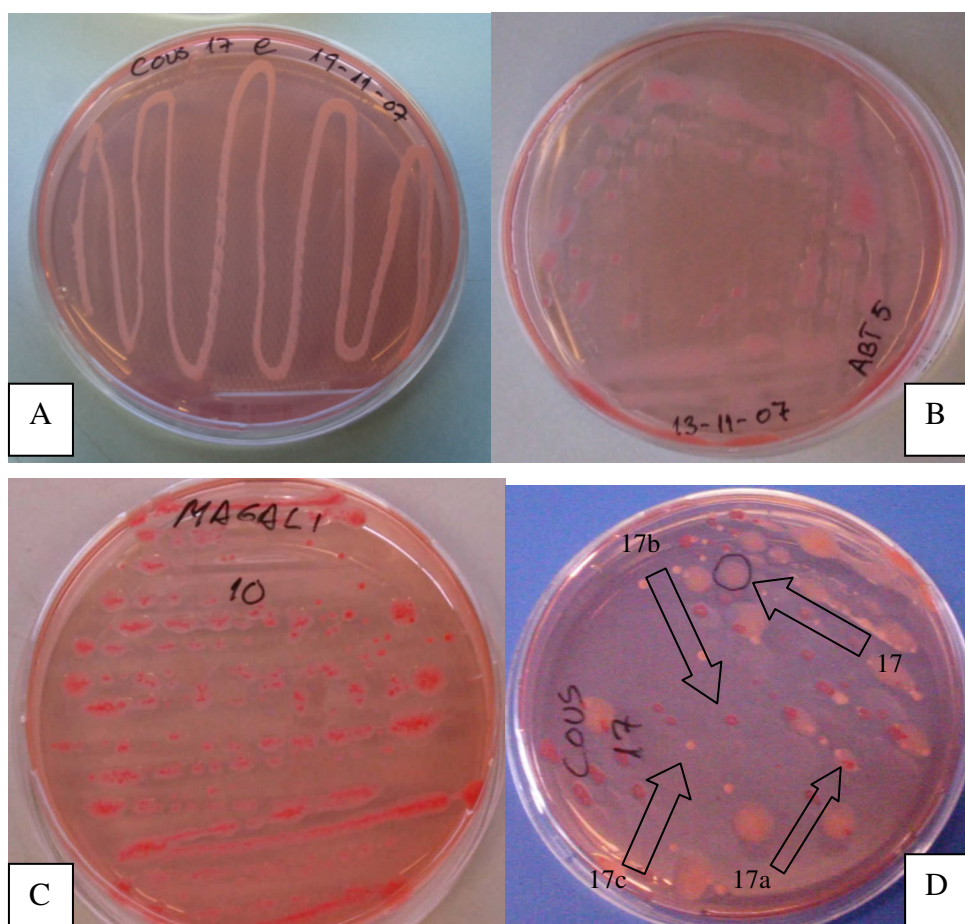


Figura 5: A, B, C e D – Colónias crescidas em placas de AML com Vermelho de Congo.

Na Figura 5:D podemos distinguir 4 tipos de colónias diferentes derivadas do isolamento de estirpes pertencentes ao mesmo nódulo de uma planta de *M. sativa* cultivar Coussouls, com diferentes absorções:

- 17- colónia com pouca absorção de VC de cor rosada;
- 17^a- colónia translúcida com um ponto vermelho ao centro;
- 17b- colónia translúcida com um círculo vermelho ao centro;
- 17c- colónias brancas em forma de ponto.

3.1.2. Caracterização em azul de bromotimol

Os isolados de *Sinorhizobium* crescidos em placas de AML com BTB (descrito em 2.1.2) foram observados ao fim do terceiro dia tendo-se verificado que acidificavam o meio, isto é, originavam uma mudança de cor do meio para amarelo (Figura 6-A), característica dos rizóbios de crescimento rápido, como os pertencentes ao género *Sinorhizobium*.



Figura 6: Culturas crescidas em placas de meio AML com azul de bromotimol, resultados do 3º dia de crescimento a 28°C.

Apenas para um dos isolados (ABT 7), não houve mudança de cor, permanecendo o meio azul, indicativo de uma reacção alcalina (Figura 6-B).

3.2. Avaliação da eficiência simbiótica

A avaliação do funcionamento das simbioses foi efectuada mediante a determinação dos pesos secos das plantas de *Medicago sativa* (5 cultivares) e de *Medicago polymorpha*. Como se pode observar pelos gráficos das Figuras 7, 8, 9, 10 e 11 e para qualquer das 5 cultivares de *M. sativa* utilizadas, não se obtiveram valores de peso seco igual ou superior aos controlos com adição de azoto (TN). De um modo geral, os valores mais elevados de peso seco da parte aérea das plantas inoculadas, com *Sinorhizobium*, foram obtidos para as plantas das cultivares Melissa (ML) (Figura 11) e Mamuntanas (MM) (Figura 10). Os valores mais baixos de peso seco das plantas inoculadas foram obtidos com a cultivar Coussouls © (Figura 9).

Para os ensaios com *M. polymorpha* obtiveram-se valores de peso seco da parte aérea iguais ou superiores ao TN das plantas inoculadas com algumas das estirpes de *Sinorhizobium*, como se pode observar pela Figura 12, sendo a maioria estirpes isoladas da cultivar Mamuntanas.

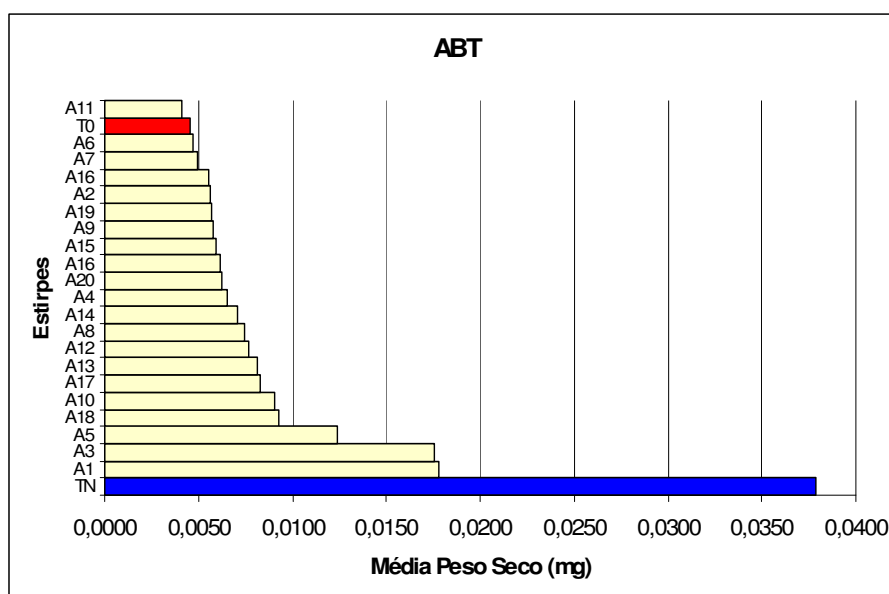


Figura 7: Peso Seco (mg), da parte aérea de plantas de *Medicago sativa* cultivar ABT, inoculadas com estirpes de *Sinorhizobium* (previamente isoladas desta mesma cultivar e designadas por A). T0= Controlo sem adição de azoto e sem inoculação (a vermelho); TN= controlo com adição de azoto (a azul).

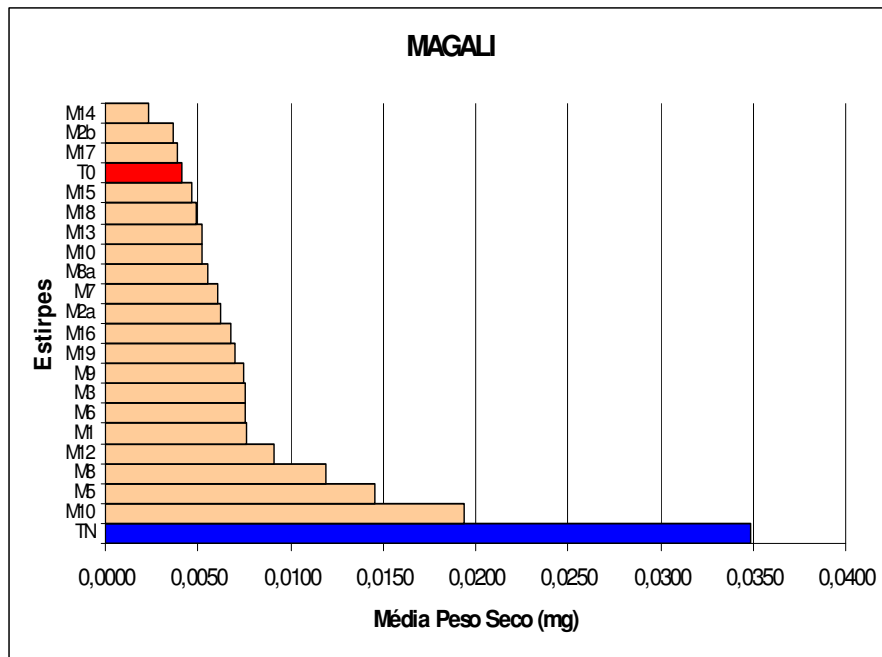


Figura 8: Peso Seco (mg), da parte aérea de plantas de *Medicago sativa* cultivar Magali, inoculadas com estirpes de *Sinorhizobium* (previamente isoladas desta mesma cultivar e designadas por M). T0= Controlo sem adição de azoto e sem inoculação (a vermelho); TN= controlo com adição de azoto (a azul).

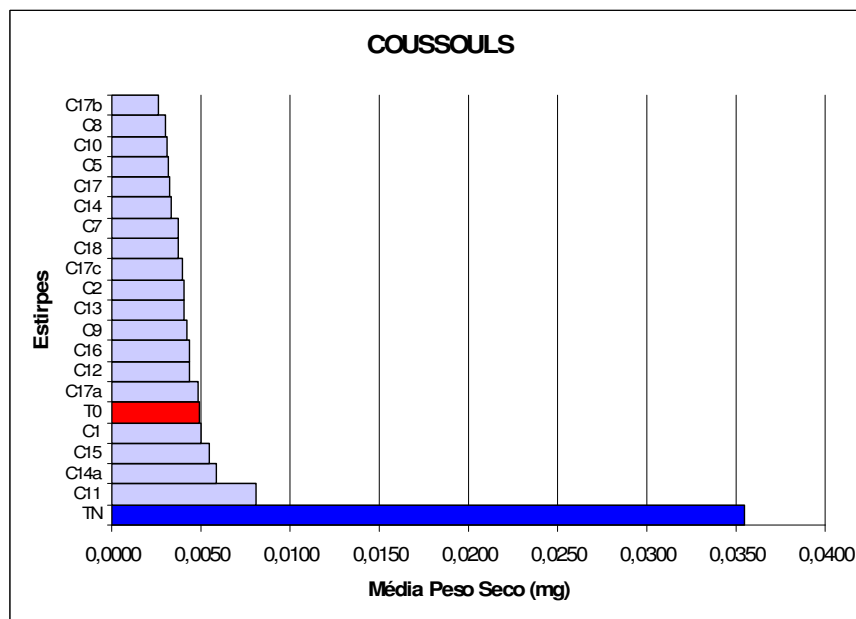


Figura 9: Peso Seco (mg), da parte aérea de plantas de *Medicago sativa* cultivar Coussouls, inoculadas com estirpes de *Sinorhizobium* (previamente isoladas desta mesma cultivar e designadas por C). T0= Controlo sem adição de azoto e sem inoculação (a vermelho); TN= controlo com adição de azoto (a azul).

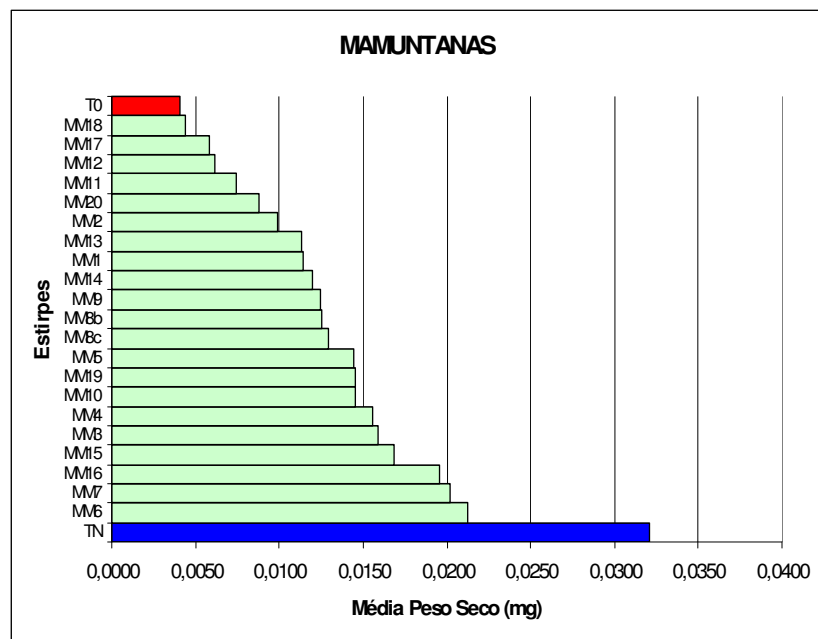


Figura 10: Peso Seco (mg), da parte aérea de plantas de *Medicago sativa* cultivar Mamuntanas, inoculadas com estirpes de *Sinorhizobium* (previamente isoladas desta mesma cultivar e designadas por MM). T0= Controlo sem adição de azoto e sem inoculação (a vermelho); TN= controlo com adição de azoto (a azul).

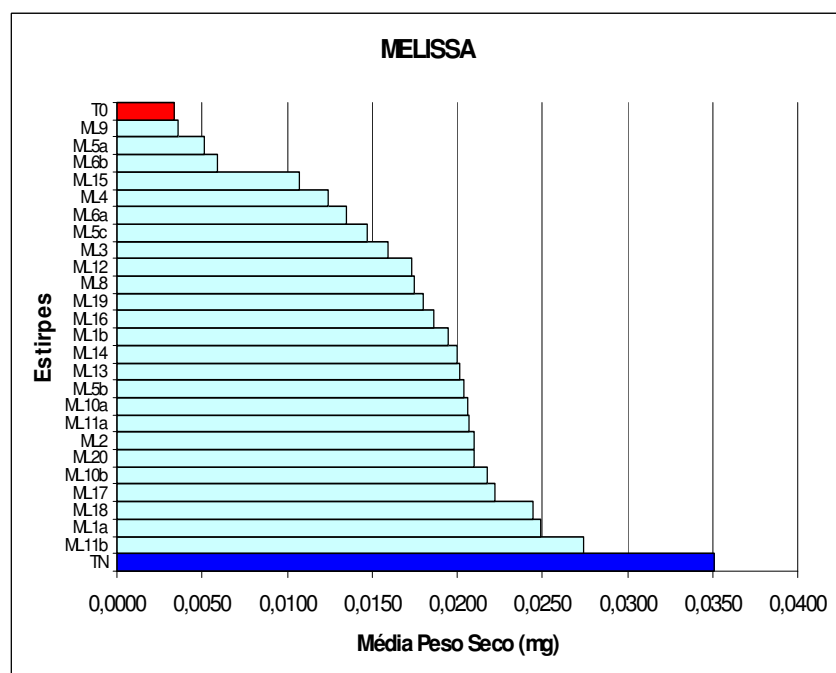


Figura 11: Peso Seco (mg), da parte aérea de plantas de *Medicago sativa* cultivar Melissa, inoculadas com estirpes de *Sinorhizobium* (previamente isoladas desta mesma cultivar e designadas por ML). T0= Controlo sem adição de azoto e sem inoculação (a vermelho); TN= controlo com adição de azoto (a azul).

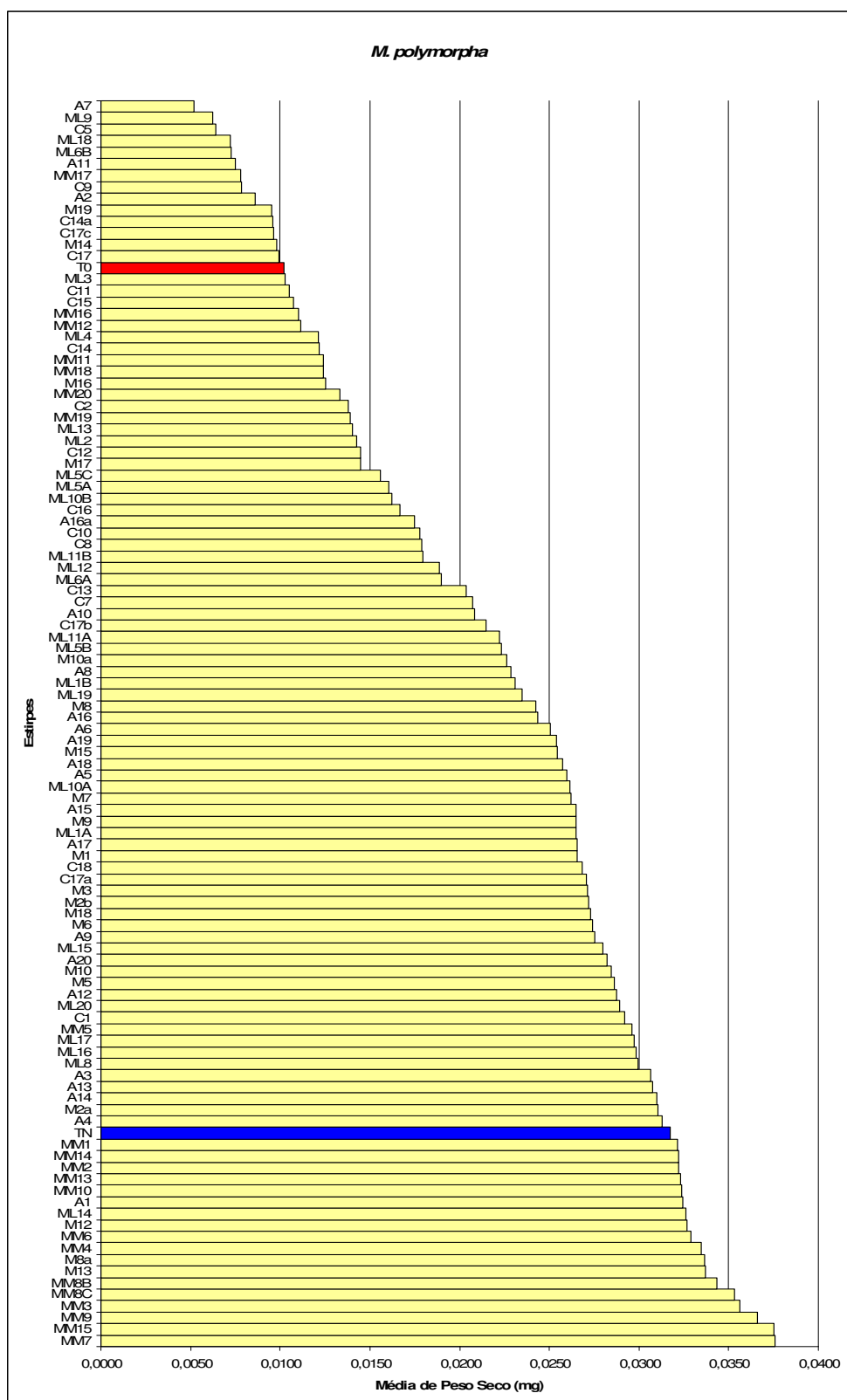


Figura 12: Peso Seco (mg), da parte aérea de plantas de *Medicago polymorpha*, inoculadas com estirpes de *Sinorhizobium* (previamente isoladas das 5 cultivares de *M. sativa*). A= ABT; M= Magali; C= Coussouls; MM= Mamuntanas; ML= Melissa; T0= Controlo sem adição de azoto e sem inoculação (a vermelho); TN= controlo com adição de azoto (a azul).

3.3. Ensaio de tolerância

Nas secções que se seguem são apresentados os resultados, sob a forma de gráficos, obtidos para os ensaios de tolerância, a diferentes temperaturas e concentrações salinas, das estirpes de *Sinorhizobium* em estudo. Estes gráficos representam as curvas de crescimento (expressas em valores de $DO_{600\text{ nm}}$), das estirpes de *Sinorhizobium* de cada uma das cultivares de *Medicago sativa*, obtidas ao longo de 6 dias de incubação. Foram utilizadas 3 réplicas por estirpe.

3.3.1. Controlos

Os gráficos das Figura 13 a 17, referem-se ao crescimento das estirpes de *Sinorhizobium* isoladas de cada uma das cultivares, crescidas durante 6 dias em meio TY líquido a 28°C, pH 6.8 e sem adição de NaCl. Como se pode verificar estes gráficos apresentam, dum modo geral, uma primeira fase de crescimento rápido, até ao 3º dia (correspondente à fase de crescimento exponencial) a que se segue uma fase de crescimento mais lenta até o 6º dia, onde os valores de $DO_{600\text{ nm}}$ atingem os valores máximos.

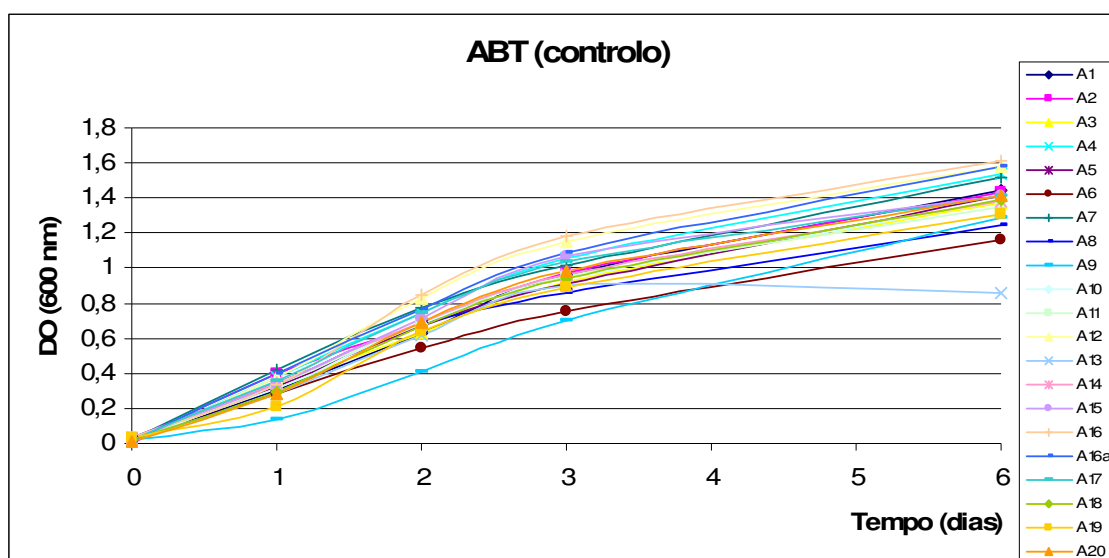


Figura 13: Curvas de crescimento (expressas em valores de $DO_{600\text{ nm}}$) das estirpes de *Sinorhizobium* isoladas da cultivar ABT durante 6 dias, em meio TY líquido a 28°C, pH=6.8 e sem adição de NaCl.

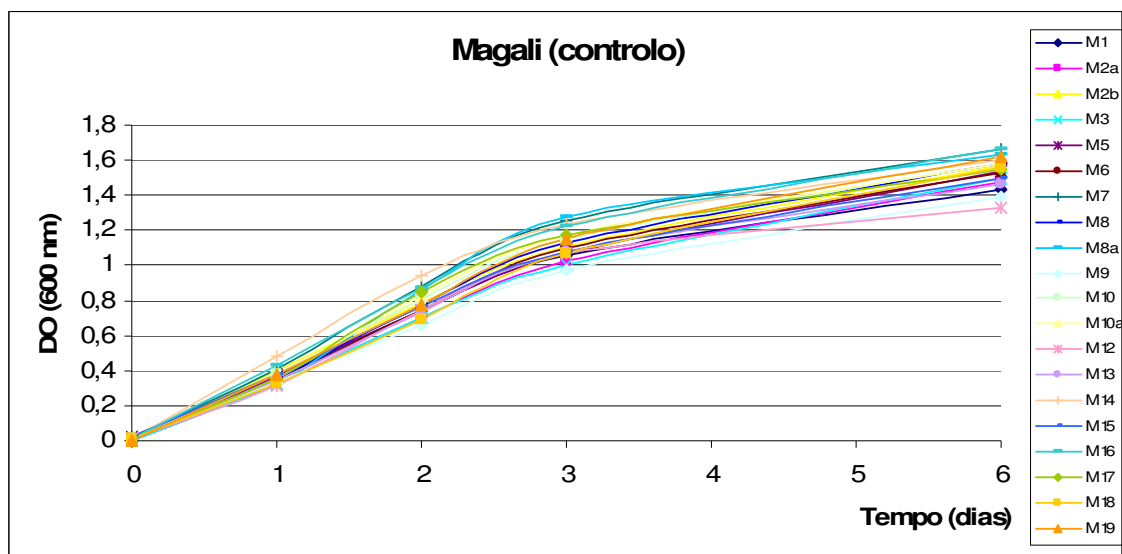


Figura 14: Curvas de crescimento (expressas em valores de DO_{600nm}) das estirpes de *Sinorhizobium* isoladas da cultivar Magali durante 6 dias, em meio TY líquido a 28°C, pH=6.8 e sem adição de NaCl.

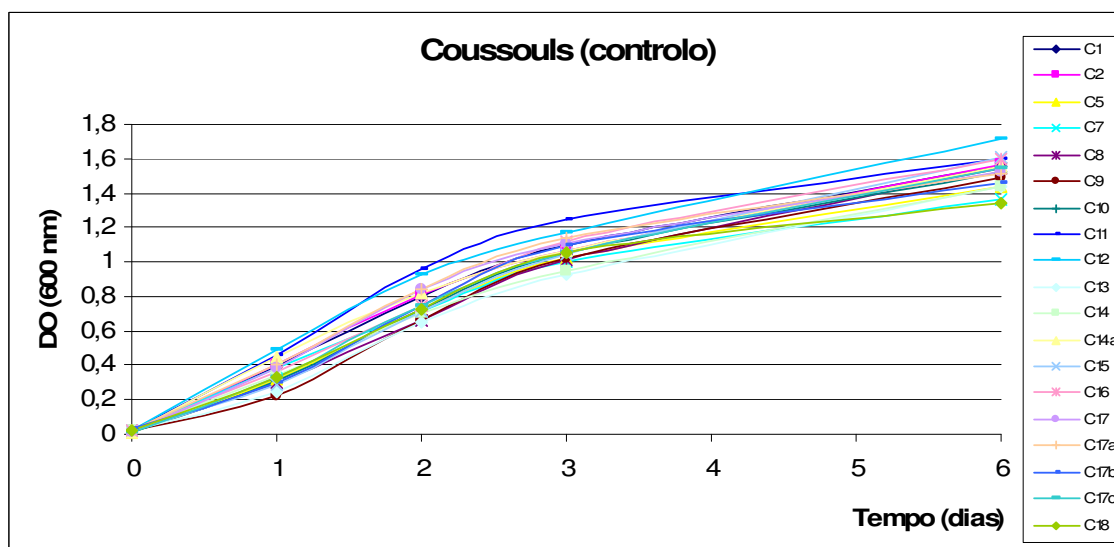


Figura 15: Curvas de crescimento (expressas em valores de DO_{600nm}) das estirpes de *Sinorhizobium* isoladas da cultivar Coussouls durante 6 dias, em meio TY líquido a 28°C, pH=6.8 e sem adição de NaCl.

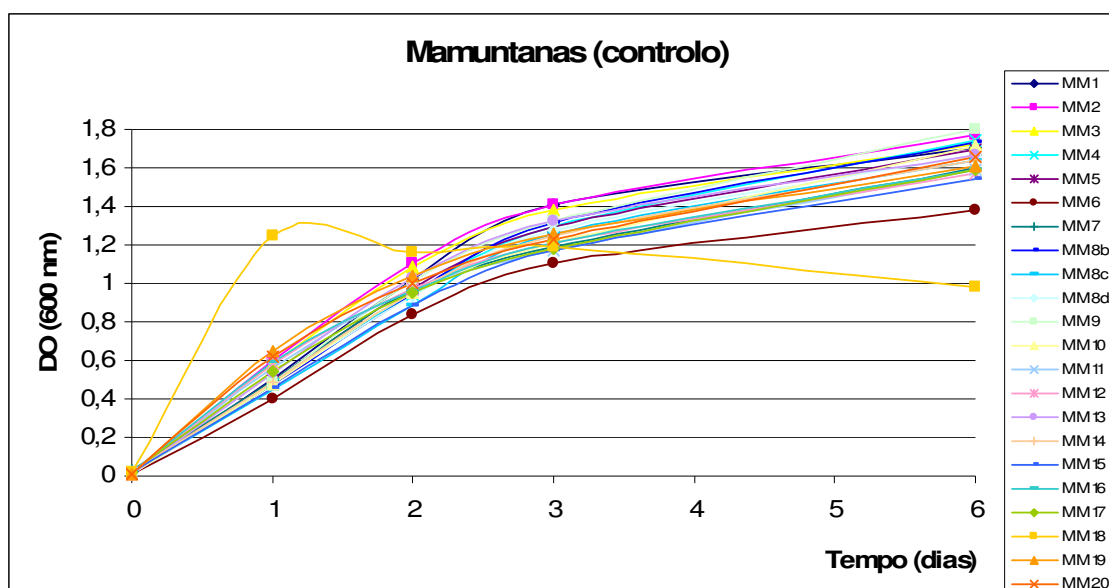


Figura 16: Curvas de crescimento (expressas em valores de DO_{600nm}) das estirpes de *Sinorhizobium* isoladas da cultivar Mamuntanas durante 6 dias, em meio TY líquido a 28°C, pH=6.8 e sem adição de NaCl.

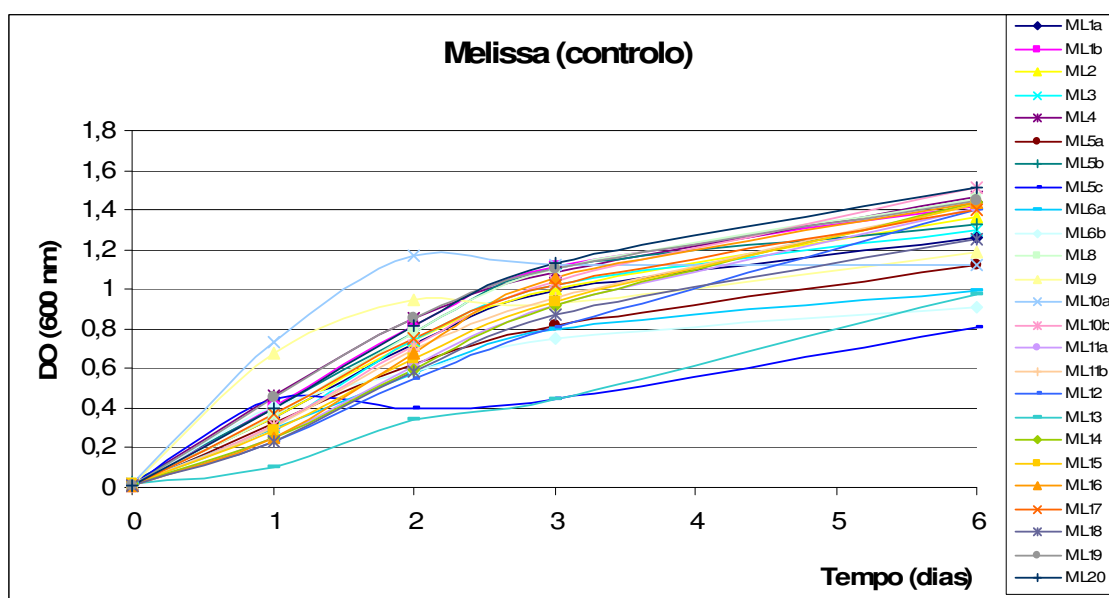


Figura 17: Curvas de crescimento (expressas em valores de DO_{600nm}) das estirpes de *Sinorhizobium* isoladas da cultivar Melissa durante 6 dias, em meio TY líquido a 28°C, pH=6.8 e sem adição de NaCl.

3.3.2. Temperatura

Nas Figuras 18 a 22 estão representados os valores de DO (os resultados de DO a 600 nm estão expressos em % relativamente ao controlo que é 100%) obtidos para as diferentes temperaturas testadas, referente ao último dia dos ensaios. Para a temperatura de 32°C as estirpes, de um modo geral, têm um crescimento semelhante ao controlo a 28°C. A 36°C as estirpes apresentaram um menor crescimento (inferior a 80% do controlo). Apenas para uma estirpe (ABT 13) a DO₆₀₀ foi superior ao controlo. A 40°C as diferenças entre as estirpes acentuam-se, verificando-se a existência de estirpes que não cresceram, ABT 3 e 8 (Figura 18) e Coussouls 5 e 18 (Figura 20) e estirpes que tiveram um crescimento superior ao controlo Melissa 9, 10^a, 10b e 11^a (Figura 22) e Mamuntanas 15 e 19 (Figura 21). A 42°C destacam-se duas estirpes, uma apresentou um ligeiro crescimento (Coussouls 14^a) e outra, Melissa 5c, apresentou um crescimento maior (cerca de 50% do valor obtido para o controlo). Os resultados obtidos para as diferentes temperaturas testadas permitiu eleger a temperatura de 40°C como sendo a melhor temperatura para a diferenciação entre estirpes tolerantes e não tolerantes, como se pode verificar pela observação dos gráficos das Figuras 23 a 27.

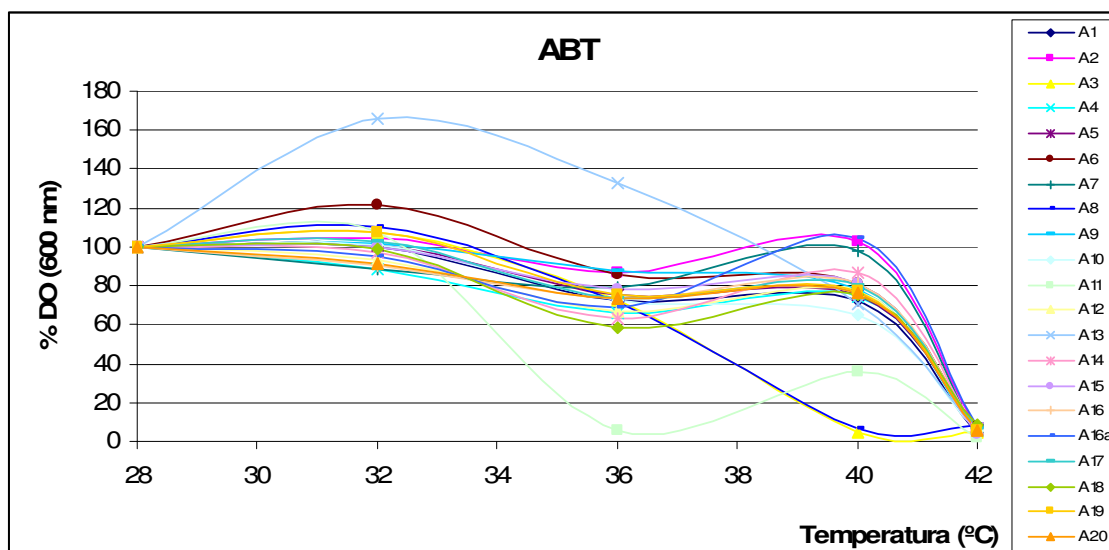


Figura 18: Resultados referentes aos valores de DO₆₀₀ obtidos para as estirpes da cultivar ABT obtidos ao fim de 6 dias, para as temperaturas de 28, 32, 36, 40 e 42°C. (Tabela 10, Anexo)

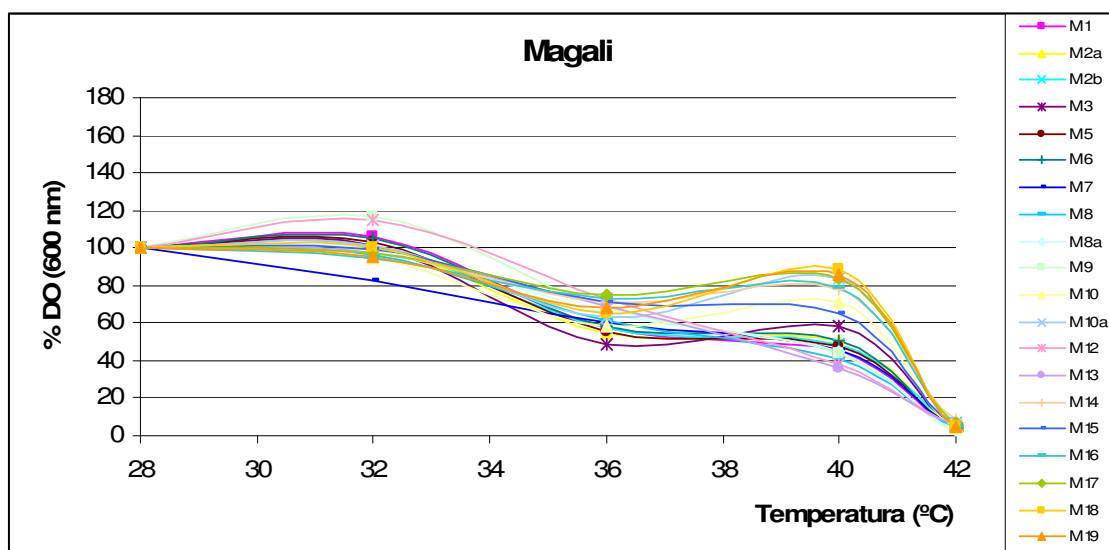


Figura 19: Resultados referentes aos valores de DO₆₀₀ em percentagem em relação ao controlo, obtidos para as estirpes da cultivar Magali obtidos ao fim de 6 dias, para as temperaturas de 28, 32, 36, 40 e 42°C.

Tabela 11, Anexo).

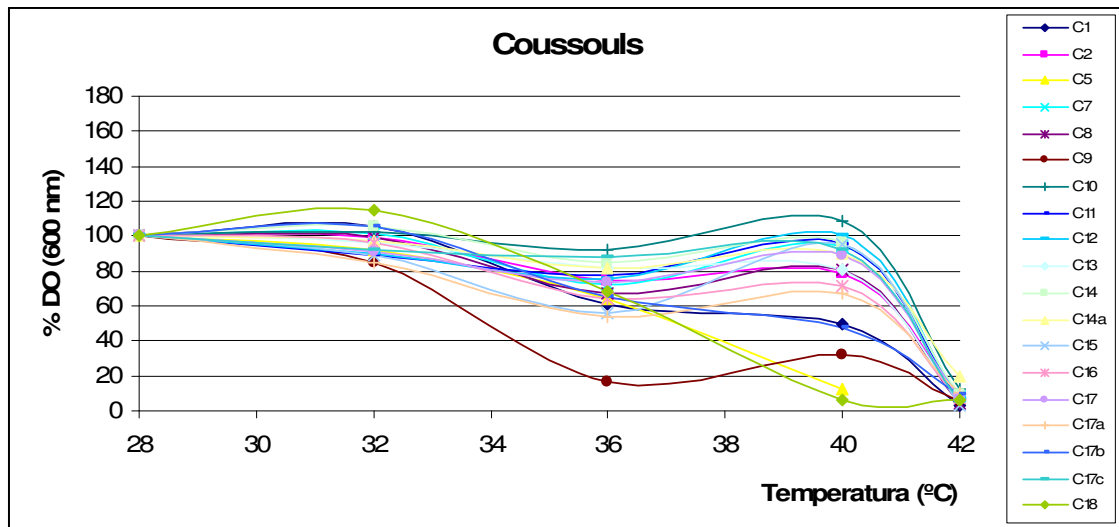


Figura 20: Resultados referentes aos valores de DO_{600} em percentagem em relação ao controlo, obtidos para as estirpes da cultivar Coussouls obtidos ao fim de 6 dias, para as temperaturas de 28, 32, 36, 40 e 42°C. (Tabela 12, Anexo)

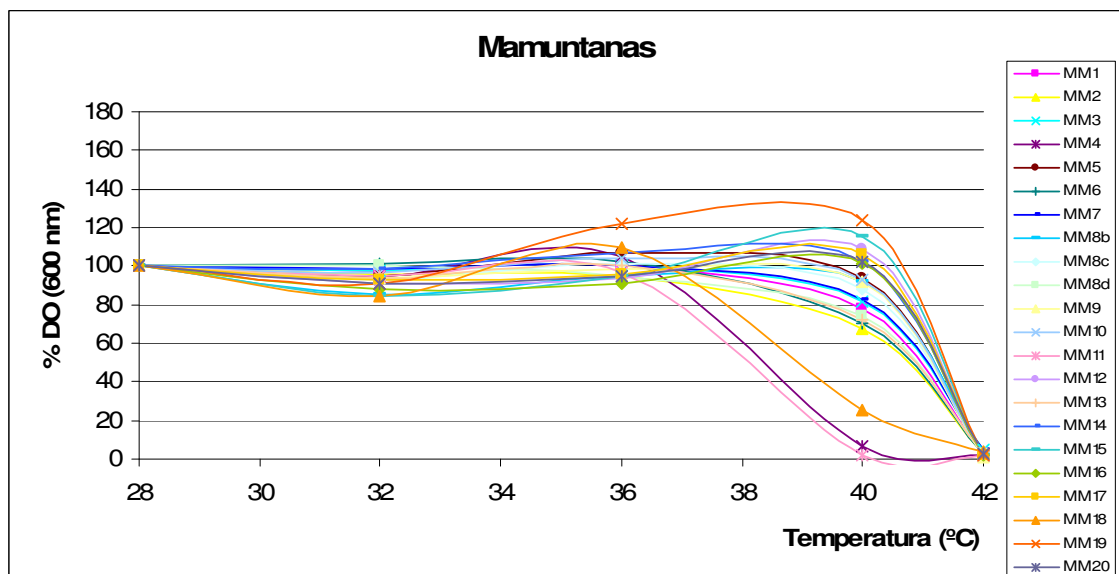


Figura 21: Resultados referentes aos valores de DO_{600} em percentagem em relação ao controlo, obtidos para as estirpes da cultivar Melissa obtidos ao fim de 6 dias, para as temperaturas de 28, 32, 36, 40 e 42°C. (Tabela 14, Anexo).

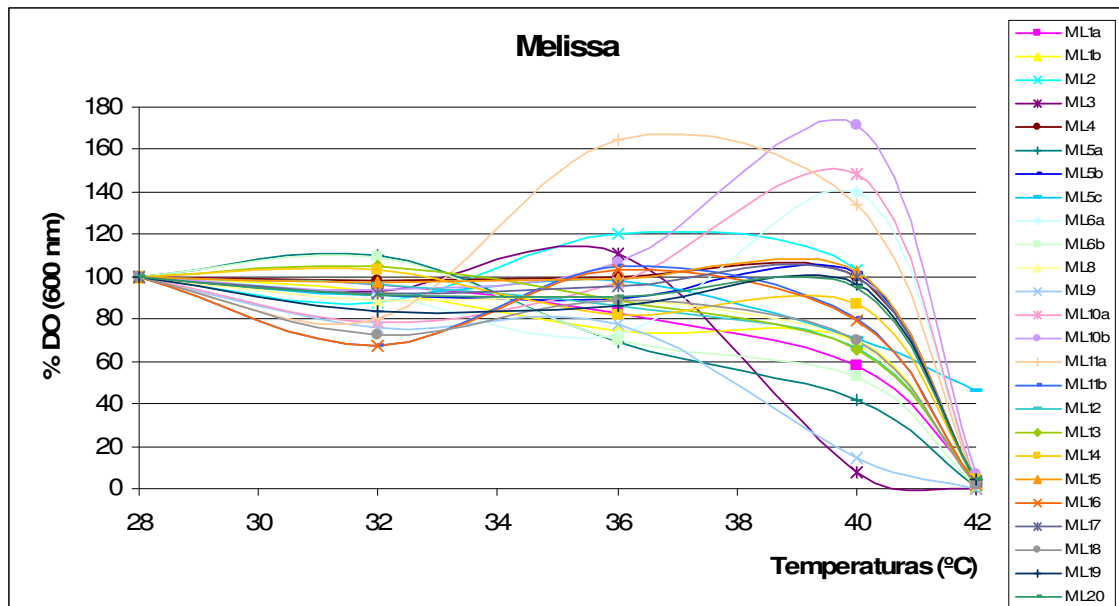


Figura 22: Resultados referentes aos valores de DO_{600} em percentagem em relação ao controlo, obtidos para as estirpes da cultivar Mamuntanas obtidos ao fim de 6 dias, para as temperaturas de 28, 32, 36, 40 e 42°C. (Tabela 13, Anexo).

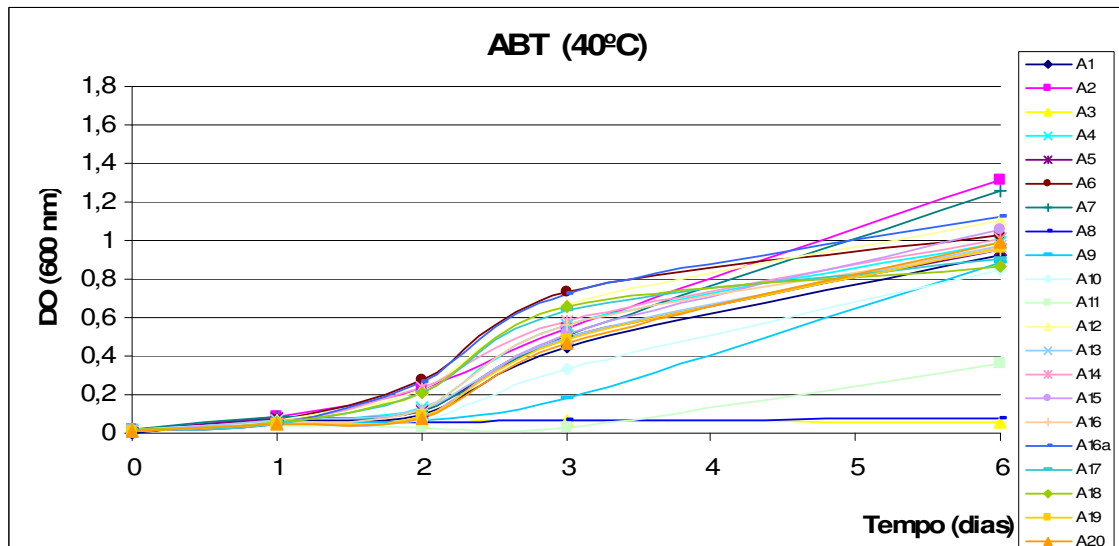


Figura 23: Resultados referentes aos valores de DO_{600} obtidos para as estirpes da cultivar ABT quando submetidas, durante 6 dias, à temperatura de 40°C.

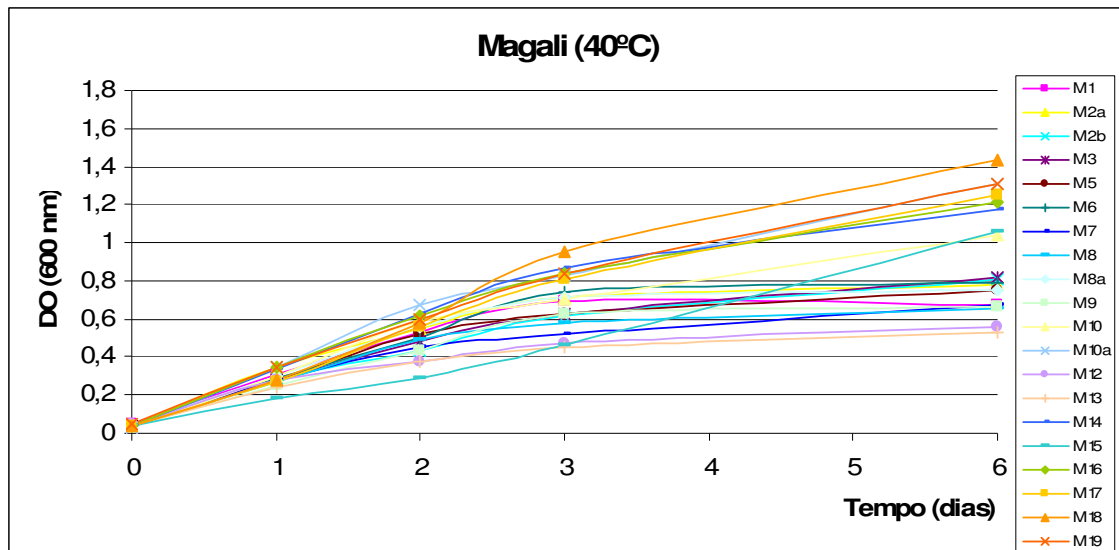


Figura 24: Resultados referentes aos valores de DO₆₀₀ obtidos para as estirpes da cultivar Magali quando submetidas, durante 6 dias, à temperatura de 40°C.

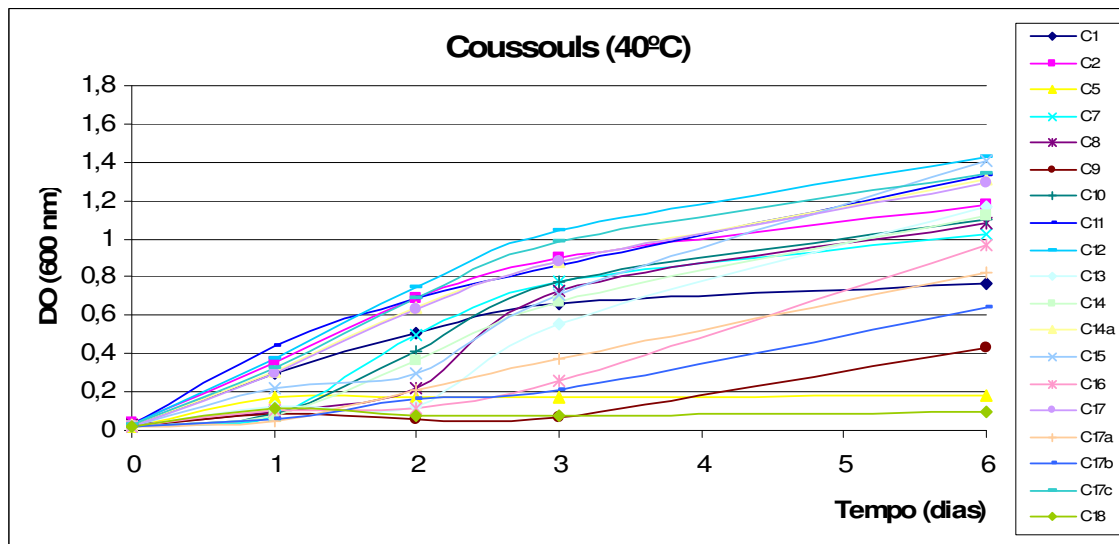


Figura 25: Resultados referentes aos valores de DO₆₀₀ obtidos para as estirpes da cultivar Coussouls quando submetidas, durante 6 dias, à temperatura de 40°C.

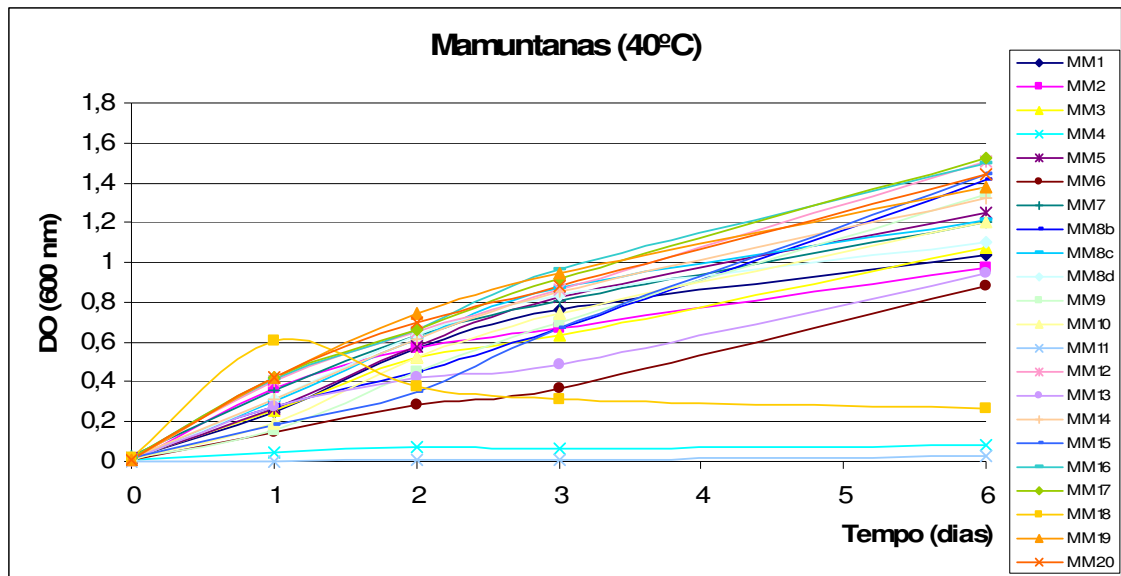


Figura 26: Resultados referentes aos valores de DO_{600} obtidos para as estirpes da cultivar Mamuntanas quando submetidas, durante 6 dias, à temperatura de 40°C.

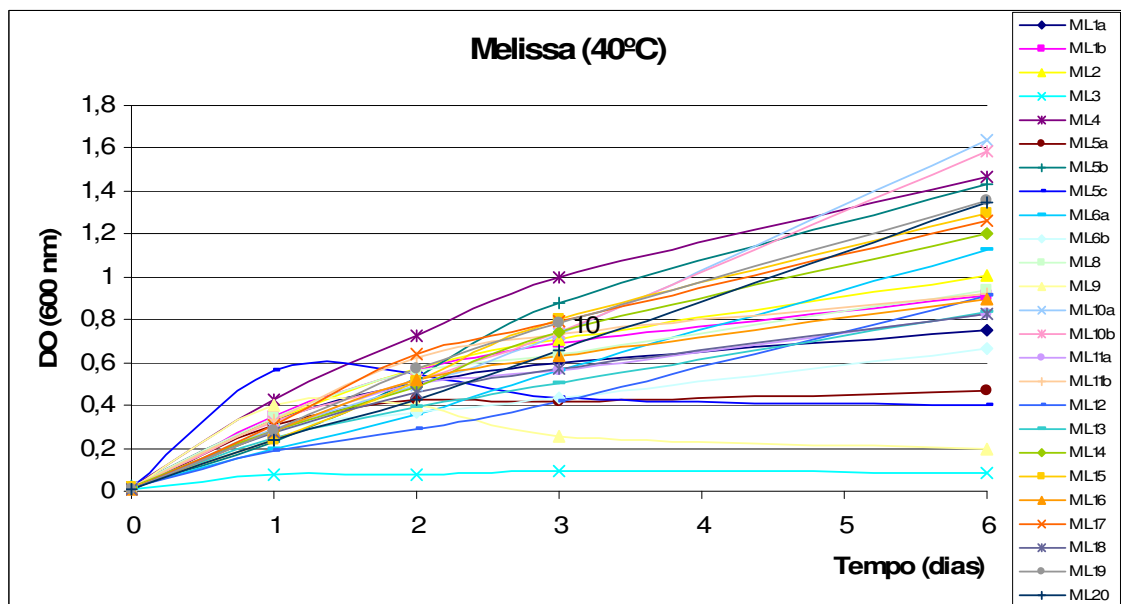


Figura 27: Resultados referentes aos valores de DO_{600} obtidos para as estirpes da cultivar Melissa quando submetidas, durante 6 dias, à temperatura de 40°C.

Observando as Figura 23 a 27 verifica-se que as estirpes da cultivar Coussouls (Figura 25) apresentaram um crescimento diferenciado com valores de DO_{600} distribuídos entre 0,095 a 1,41.

No caso das estirpes da cultivar ABT (Figura 23), não há valores de DO₆₀₀ intermédios, havendo 3 estirpes que não apresentaram crescimento, tendo as restantes valores máximos de DO₆₀₀ entre 0,87 e 1,315.

Para as estirpes da cultivar Magali (Figura 24) verificou-se que a maioria está distribuída por 2 grupos de valores máximos de DO₆₀₀ compreendidos entre 1,215 – 1,435 e 0,53 – 0,815.

As estirpes das cultivares Melissa (Figura 27) e Mamuntanas (Figura 26) apresentam um crescimento semelhante, sendo estas onde se encontram as estirpes com maior tolerância à temperatura, havendo um número reduzido com valores de DO₆₀₀ inferiores a 0,6.

3.3.3. Salinidade

A observação dos gráficos das Figuras 28 a 32 permite verificar que as estirpes de um modo geral cresceram melhor na concentração de 100 mM de NaCl do que na concentração de 20 mM, com a excepção de algumas estirpes que apresentaram valores semelhantes para as duas concentrações. A 500 mM há uma nítida distinção entre estirpes extremamente tolerantes (crescimento > 100%), muito tolerantes (crescimento 100 a 80%), medianamente tolerantes (crescimento 80 a 60%) e pouco tolerantes (crescimento 60 a 40%), não se registando nenhuma estirpe que não apresentasse algum grau de tolerância. As estirpes mais tolerantes para esta concentração foram as isoladas da cultivar Melissa, respectivamente 11^a e 5c. Na concentração de 1M foi observada tolerância apenas para 7 estirpes pertencentes à cultivar Melissa (ML1a, ML5c, ML8, ML9, ML10a, ML10b, ML11b) e 2 estirpes de Mamuntanas (MM18 e MM19). No entanto, a concentração de NaCl que se revelou ser a melhor para a diferenciação entre estirpes, foi a de 500 mM, como se pode verificar pela observação dos gráficos das Figuras 33 a 37, excepto para as duas estirpes de Mamuntanas atrás referidas que são muito mais tolerantes que as restantes a 1M, do que a 500 mM.

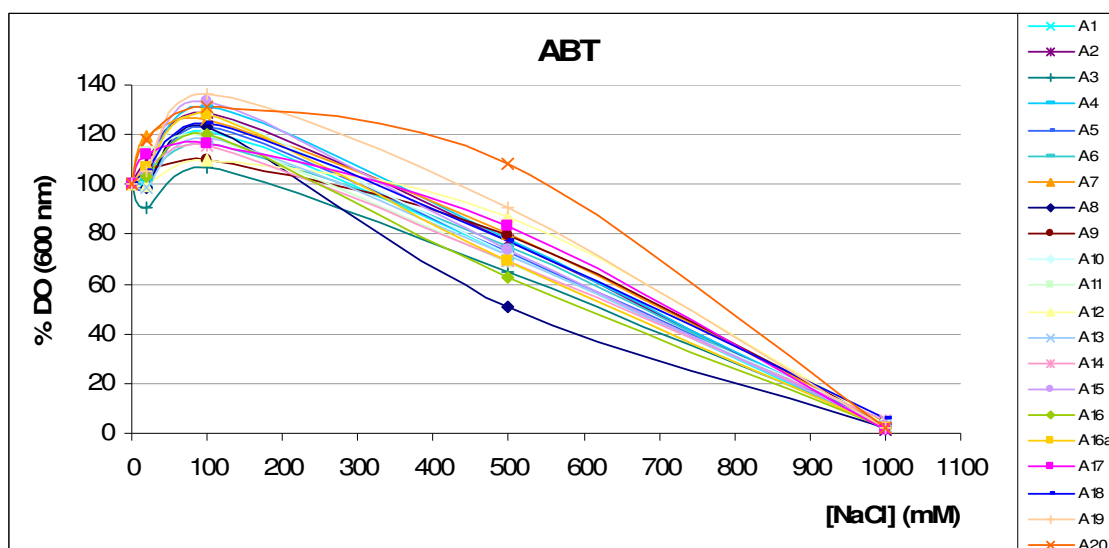


Figura 28: Resultados referentes aos valores de DO_{600} em percentagem em relação ao controlo (em Anexo), obtidos para as estirpes da cultivar ABT obtidos ao fim de 6 dias, para as concentrações de NaCl de 0, 20, 100, 500 mM e 1M. (Tabela 15, Anexo).

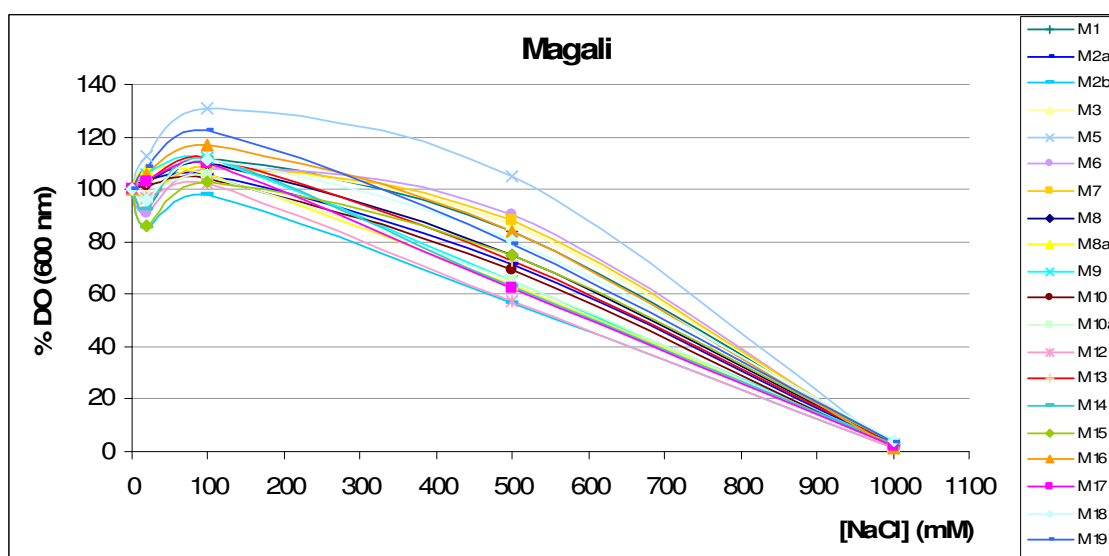


Figura 29: Resultados referentes aos valores de DO_{600} em percentagem em relação ao controlo, obtidos para as estirpes da cultivar Magali obtidos ao fim de 6 dias, para as concentrações de NaCl de 0, 20, 100, 500 mM e 1M. (

Tabela 16, Anexo)

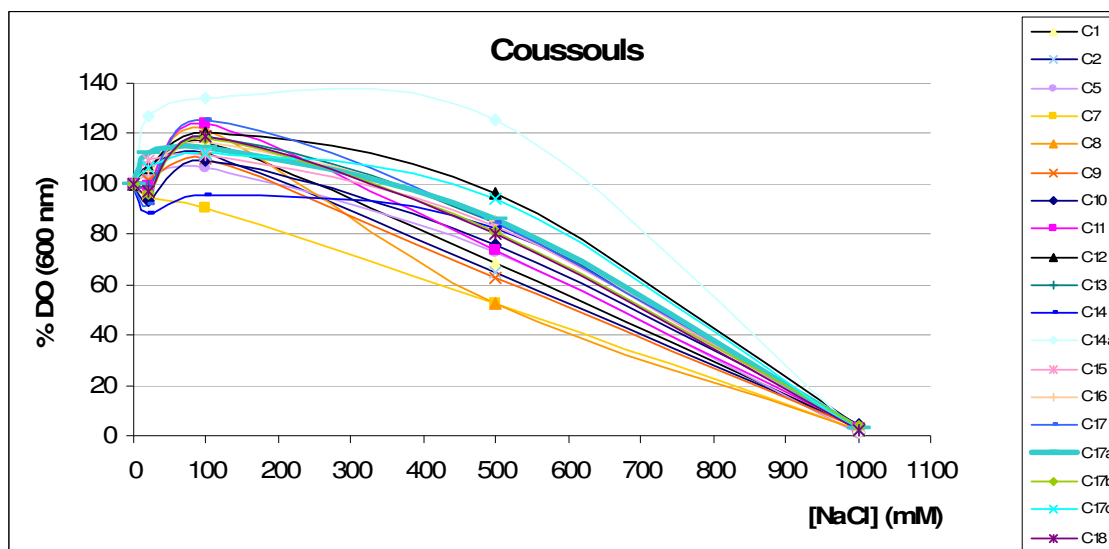


Figura 30: Resultados referentes aos valores de DO_{600} em percentagem em relação ao controlo, obtidos para as estirpes da cultivar Coussouls obtidos ao fim de 6 dias, para as concentrações de NaCl de 0, 20, 100, 500 mM e 1M. (

Tabela 17, Anexo)

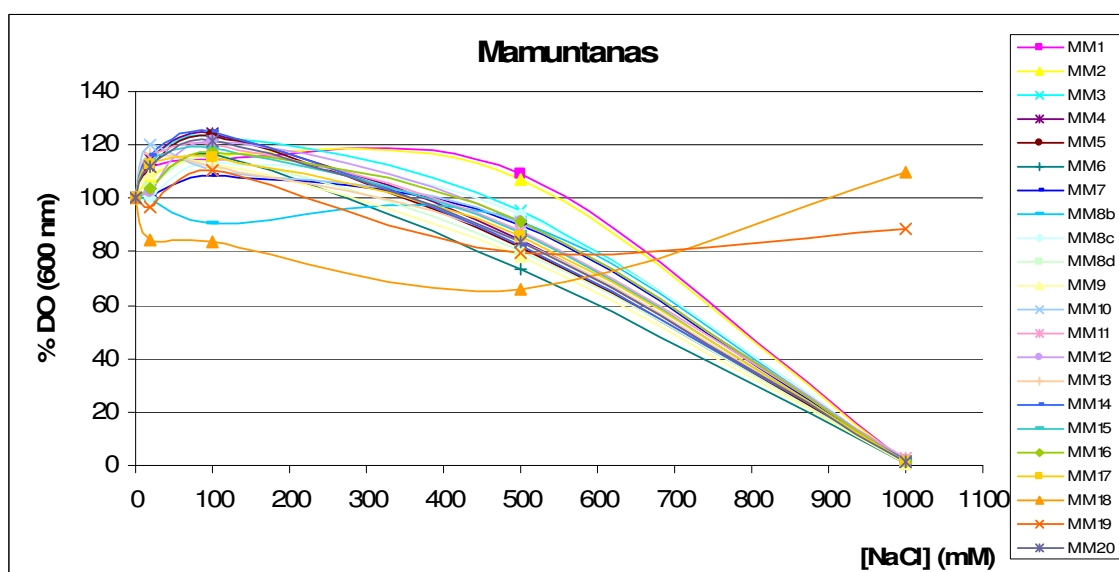


Figura 31: Resultados referentes aos valores de DO_{600} em percentagem em relação ao controlo, obtidos para as estirpes da cultivar Mamuntanas obtidos ao fim de 6 dias, para as concentrações de NaCl de 0, 20, 100, 500 mM e 1M. (Tabela 19, Anexo)

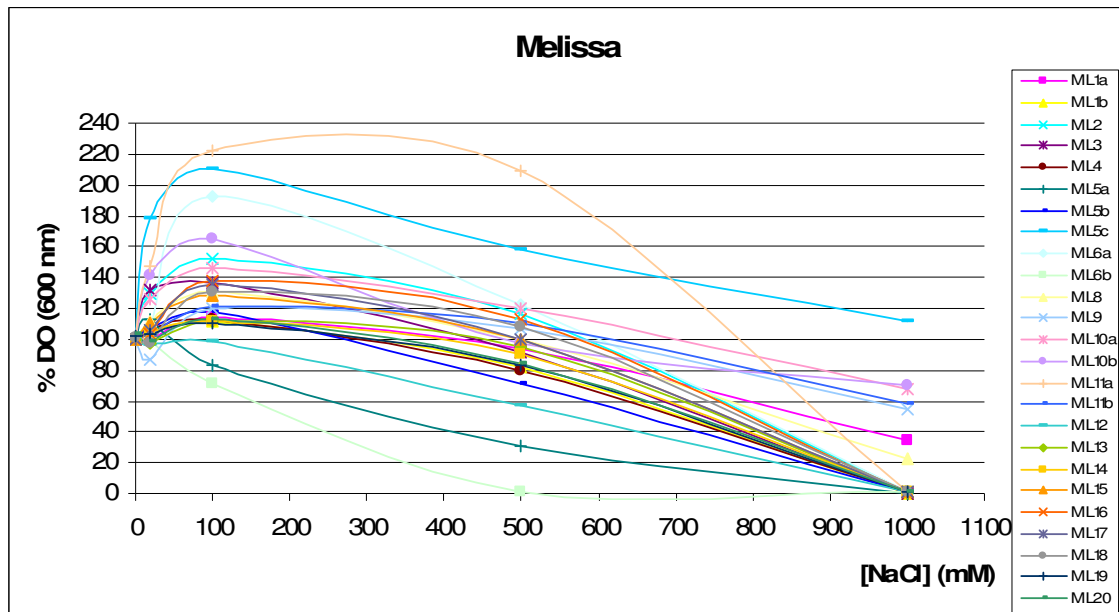


Figura 32: Resultados referentes aos valores de DO_{600} em percentagem em relação ao controle, obtidos para as estirpes da cultivar Melissa obtidos ao fim de 6 dias, para as concentrações de NaCl de 0, 20, 100, 500 mM e 1M. (

Tabela 18, Anexo).

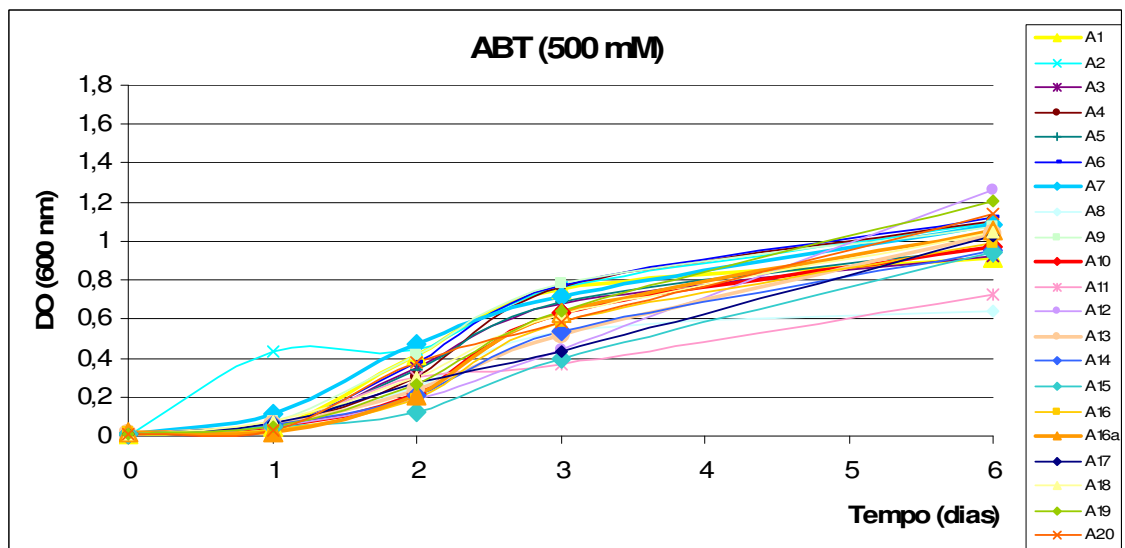


Figura 33: Resultados referentes aos valores de DO_{600} obtidos para as estirpes da cultivar ABT quando submetidas, durante 6 dias, à concentração de NaCl de 500 mM.

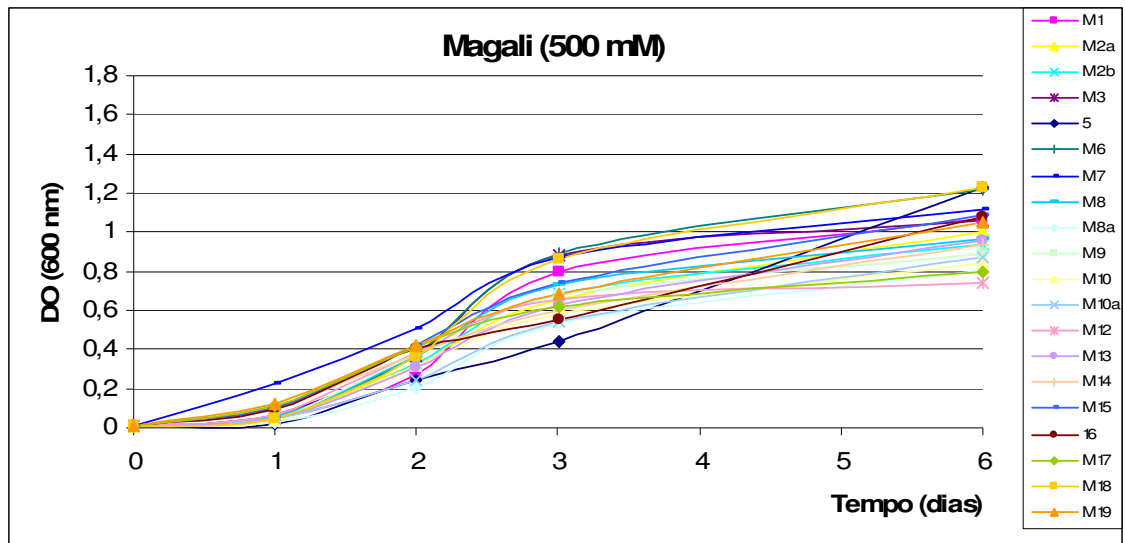


Figura 34: Resultados referentes aos valores de DO_{600} obtidos para as estirpes da cultivar Magali quando submetidas, durante 6 dias, à concentração de NaCl de 500 mM.

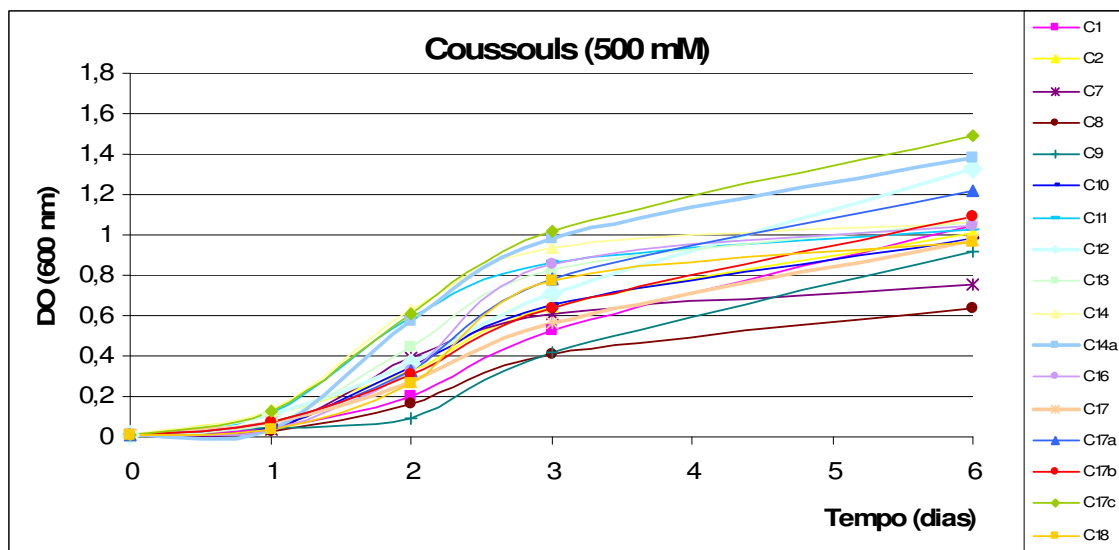


Figura 35: Resultados referentes aos valores de DO_{600} obtidos para as estirpes da cultivar Coussouls quando submetidas, durante 6 dias, à concentração de NaCl de 500 mM.

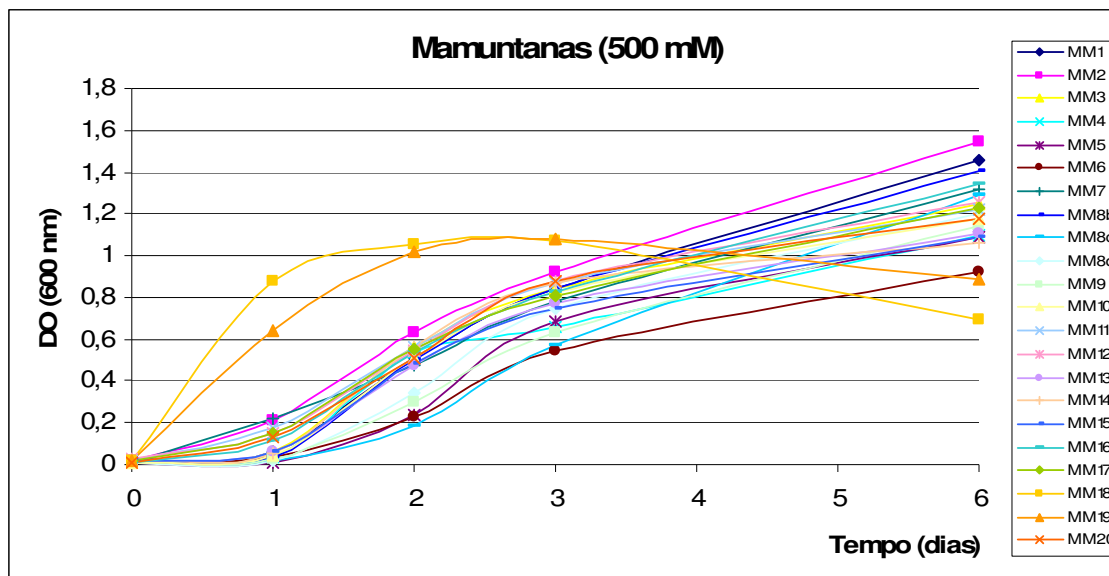


Figura 36: Resultados referentes aos valores de DO_{600} obtidos para as estirpes da cultivar Mamuntanas quando submetidas, durante 6 dias, à concentração de NaCl de 500 mM

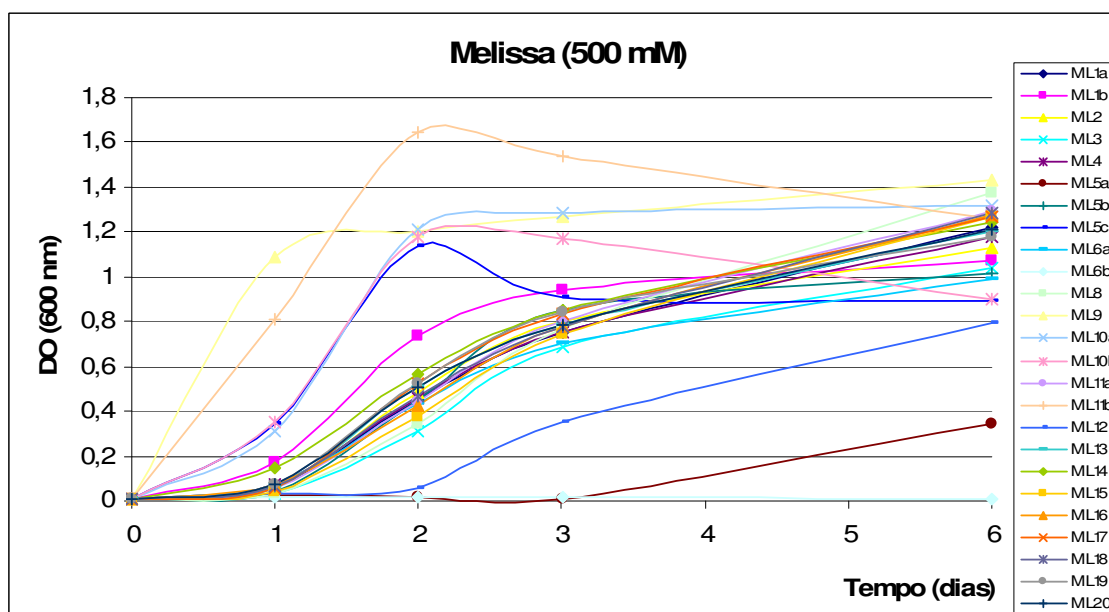


Figura 37: Resultados referentes aos valores de DO_{600} obtidos para as estirpes da cultivar Melissa quando submetidas, durante 6 dias, à concentração de NaCl de 500 mM

Como se pode verificar nas Figuras 33 à 37 os valores de DO_{600} máximos pertencem às estirpes isoladas da cultivares Coussouls e Mamuntanas e os menores às estirpes ABT. De um modo geral, nenhum padrão de crescimento se assemelha ao observado nos controlos (Figuras 13 à 17). Verificou-se que no 6º dia que apenas os valores de DO_{600}

das estirpes isoladas das cultivares ABT e Magali eram inferiores aos obtidos pelos respectivos controlos (1.4 e 1.7).

3.4. Análise de DNA genómico

3.4.1. DNA total

As amostras de DNA genómico extraídas das estirpes de *Sinorhizobium sp.* isoladas das 5 cultivares de *Medicago sativa* foram submetidas a uma primeira electroforese em gel de agarose a 1% (Figura 38), para visualização da banda correspondente ao DNA.

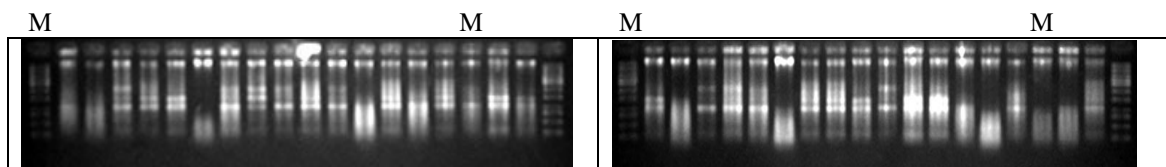


Figura 38: Géis de electroforese em agarose 1% correspondente às amostras de DNA genómico extraído de estirpes de *Sinorhizobium*. M= marcador de pesos moleculares de 1kb (10000 -250 pb).

3.4.2. REP-PCR

Os produtos de DNA amplificados relativos às estirpes de *Sinorhizobium*, quando se utilizaram os *primers* REP, geraram diferentes fragmentos (bandas) com pesos moleculares que variaram entre 6.900 e 570 pb aproximadamente e foram visualizados após electroforese em gel de agarose a 1%, conforme se pode observar nas Figuras 39 à 43. Também nestas figuras se encontram os respectivos dendogramas tendo a sua análise permitido verificar a existência de uma larga diversidade genética entre a população de *Sinorhizobium* estudada.

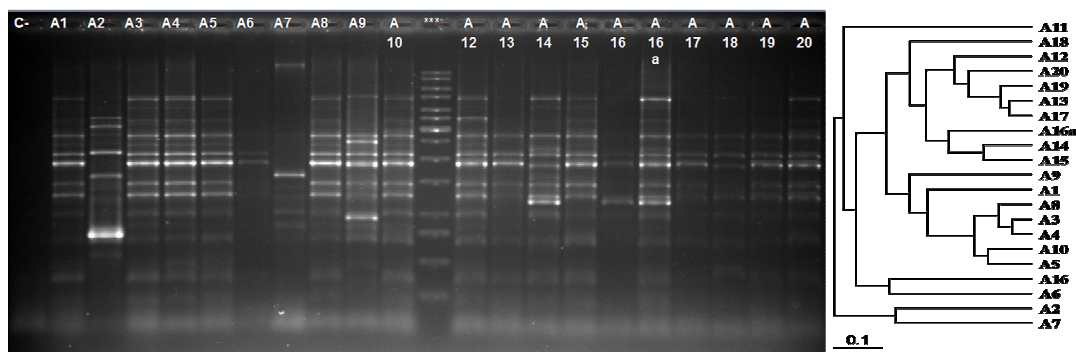


Figura 39: Gel de electroforese e respectivo dendograma, resultante da amplificação por REP-PCR, referente às estirpes de *Sinorhizobium* isoladas da cultivar ABT. ***= Marcador de pesos moleculares de 1kb (10000 -250 pb) C- = controlo negativo (sem DNA).

Na Figura 39, correspondente ao gel obtido para as estirpes isoladas da cultivar ABT e respectivo dendograma, observa-se a existência de perfis semelhantes entre as diferentes estirpes, tendo dado origem a 3 grupos de semelhança, um dos quais engloba a maioria das estirpes e poderá estar subdividido com uma percentagem de semelhança de 70%. Os outros dois grupos englobam cada um apenas 2 estirpes (A16 e A6) e (A2 e A7), respectivamente, encontrando-se a estirpe A11 isolada. O gel correspondente a esta ultima estirpe encontra-se no Anexo, Figura 65 A.

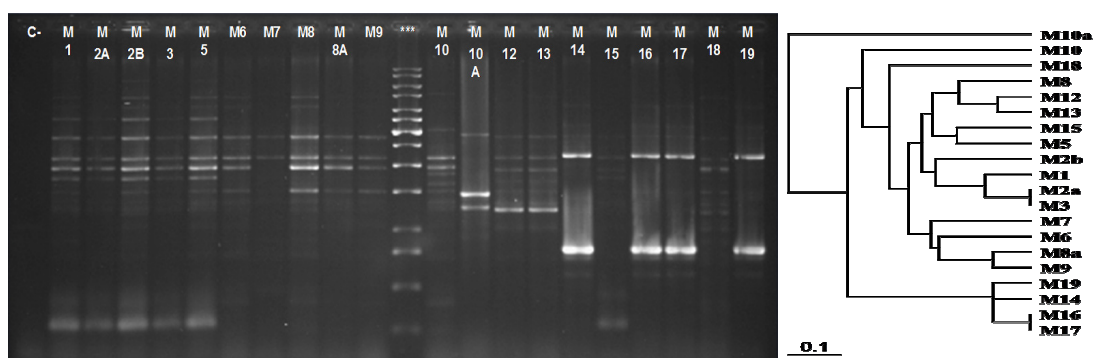


Figura 40: Gel de electroforese e respectivo dendograma, resultante da amplificação por REP-PCR, referente às estirpes de *Sinorhizobium* isoladas da cultivar Magali. ***= Marcador de pesos moleculares de 1kb (10000 -250 pb) C- = controlo negativo (sem DNA).

O gel da Figura 40 correspondente às estirpes da cultivar Magali, permite observar a existência de um grupo de estirpes (M14, M16, M17 e M19) com duas bandas predominantes com os pesos moleculares de 2100 pb e 720 pb aproximadamente. O gel põe também em evidencia a diferença existente entre a estirpe M10a relativamente às outras estirpes, o que é igualmente confirmado pelo dendograma, onde a estirpe M10a está colocada num ramo separado das restantes que se encontram agrupadas entre si.

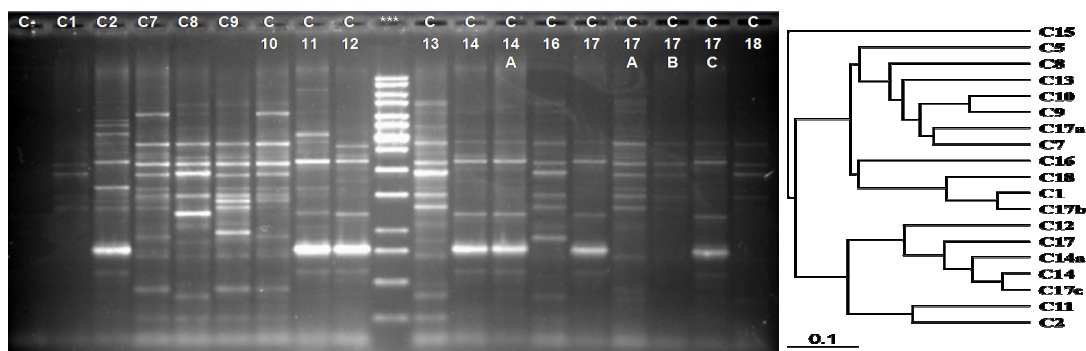


Figura 41: Gel de electroforese e respectivo dendograma, resultante da amplificação por REP-PCR, referente às estirpes de *Sinorhizobium* isoladas da cultivar Coussouls. ***= Marcador de pesos moleculares de 1kb (10000 -250 pb) C- = controlo negativo (sem DNA).

No gel da Figura 41 é possível observar em algumas estirpes de *Sinorhizobium* da cultivar Coussouls a existência de uma banda mais espessa (720 pb) o que permitiu reunir estas estirpes num mesmo grupo que se subdivide em dois sub-grupos, com C2 e C11 num grupo e C12, C17, C14a, C14, C17c noutro. O gel correspondente às estirpes C5 e C18 encontra-se no Anexo, Figura 65 B.

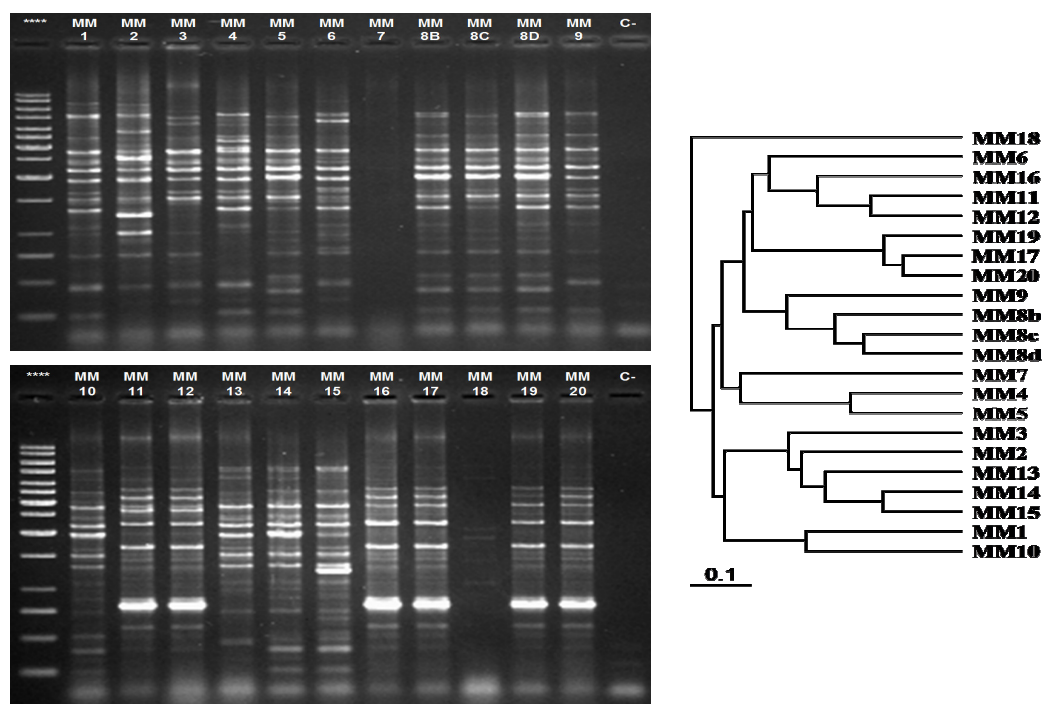


Figura 42: Géis de electroforese e respectivo dendograma, resultante da amplificação por REP-PCR, referentes às estirpes de *Sinorhizobium* isoladas da cultivar Mamuntanas. ***= Marcador de pesos moleculares de 1kb (10000 -250 pb) C- = controlo negativo (sem DNA).

Na Figura 42, é possível observar no 2º gel, em 6 amostras correspondentes às estirpes MM11, MM12, MM16, MM17, MM19 e MM20 a presença de uma banda mais espessa, aproximadamente de 750 pb, encontrando-se estas estirpes reunidas num

mesmo grupo que se subdivide em dois. O dendograma permite também observar a existência de 6 grupos com 70% de semelhança.

Na Figura 43, pela observação do 1º gel de electroforese é possível distinguir 3 estirpes com perfis muito semelhantes (ML2, ML1a, ML1b), estando estas estirpes, no dendograma, reunidas num subgrupo com nível de semelhança acima de 90%. No dendograma é ainda possível verificar que as estirpes foram reunidas em 6 grupos para um nível de 70% de semelhança.

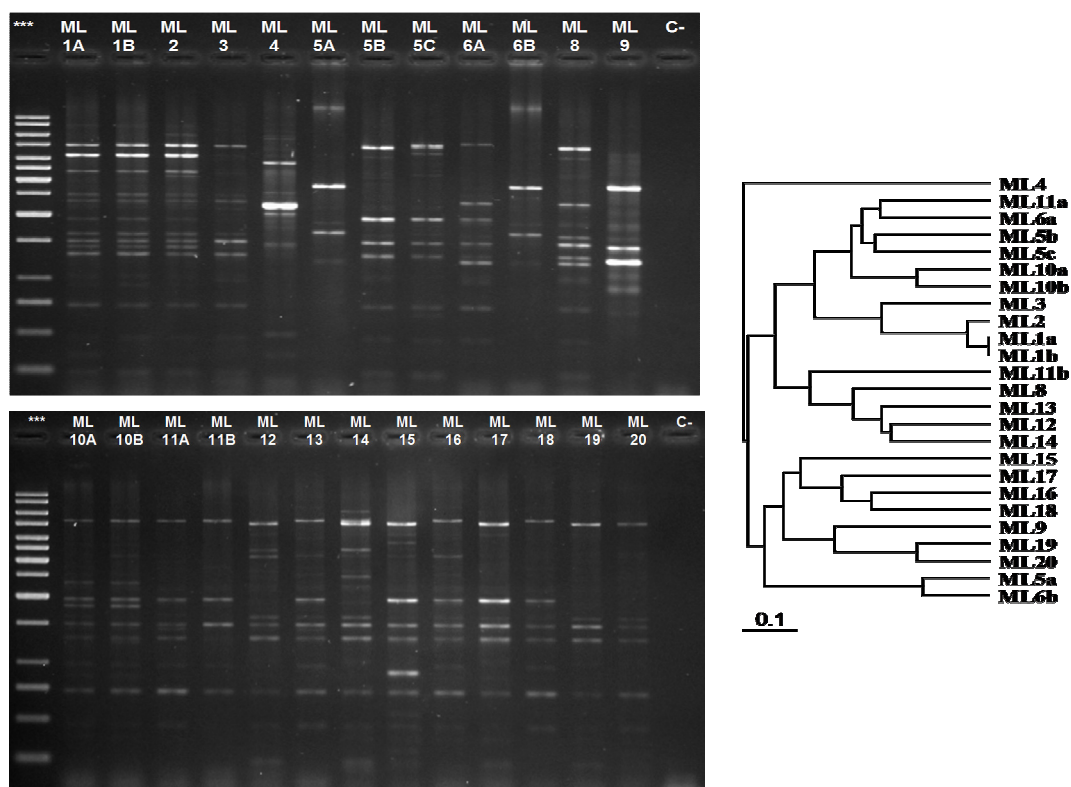


Figura 43: Géis de electroforese e respectivo dendograma, resultante da amplificação por REP-PCR, referente às estirpes de *Sinorhizobium* isoladas da cultivar Melissa. ***= Marcador de pesos moleculares de 1kb (10000 -250 pb) C- = controlo negativo (sem DNA).

3.4.3. ERIC-PCR

As amostras de DNA das estirpes de *Sinorhizobium* em estudo foram também utilizadas para a amplificação com os *primers* ERIC, servindo igualmente de informação para o estudo da diversidade genética. Os géis e respectivos dendogramas obtidos, encontram-se nas Figura 44 a 48.

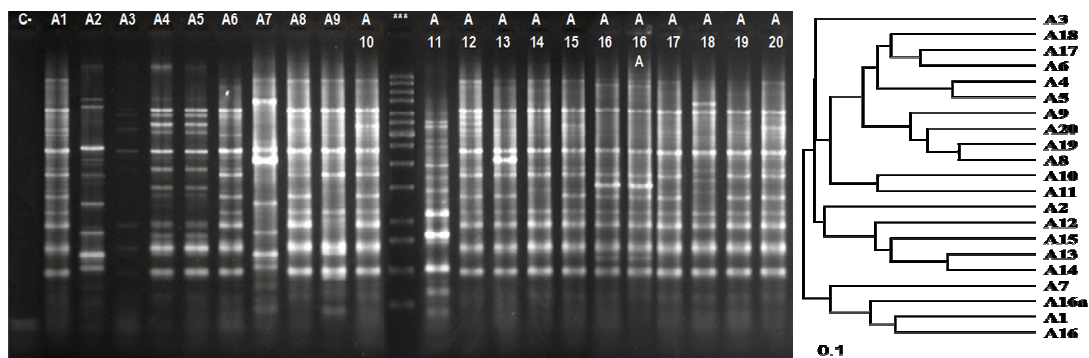


Figura 44: Gel de electroforese e respectivo dendograma, resultante da amplificação por ERIC-PCR, referente às estirpes de *Sinorhizobium* isoladas da cultivar ABT. ***= Marcador de pesos moleculares de 1kb (10000 -250 pb) C- = controlo negativo (sem DNA).

No gel da Figura 44 é possível observar que os perfis dos fragmentos de DNA obtidos para as diferentes estirpes de *Sinorhizobium* da cultivar ABT possuíam um grande número de bandas. No dendograma é possível obter 4 grupos com 70% de semelhança, não existindo estirpes com percentagem de semelhança acima de 90%.

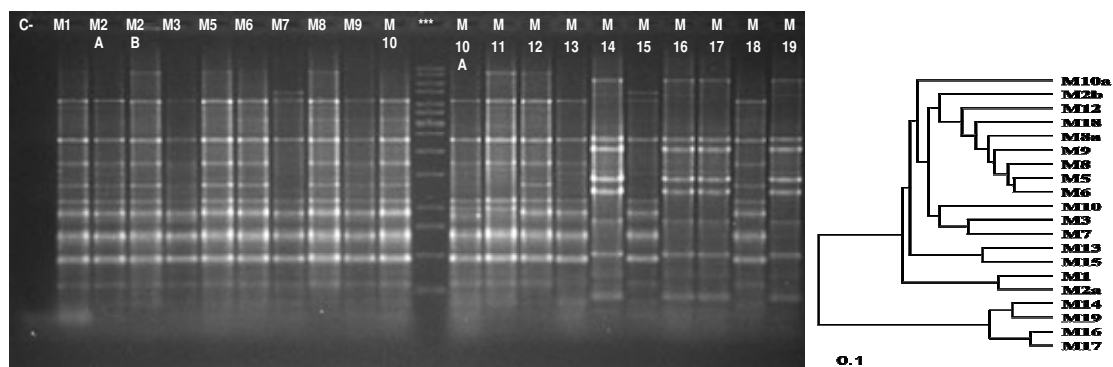


Figura 45: Gel de electroforese e respectivo dendograma, resultante da amplificação por ERIC-PCR, referente às estirpes de *Sinorhizobium* isoladas da cultivar Magali. ***= Marcador de pesos moleculares de 1kb (10000 -250 pb) C- = controlo negativo (sem DNA).

No gel da Figura 45 verifica-se a existência de um grande número de bandas comuns a todas as estirpes, não havendo por isso grandes diferenças entre as estirpes. A observação do dendograma, permite verificar que a maioria das estirpes pertencem a um mesmo grupo com uma percentagem de semelhança de cerca de 75%. No entanto, este grupo pode ainda ser subdividido em 4 subgrupos com uma percentagem de semelhança

ligeiramente superior, isto é, de cerca de 80%. No outro grupo as estirpes (M14, M16, M17 e M19) foram agrupadas com uma percentagem de semelhança muito próxima de 90%.

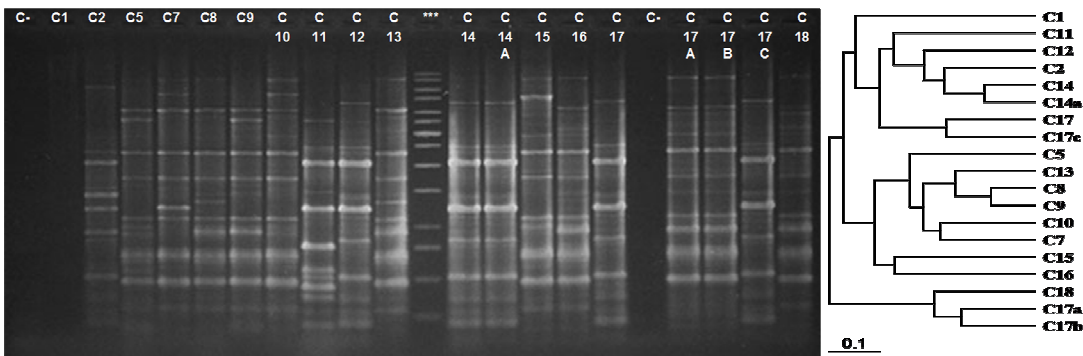
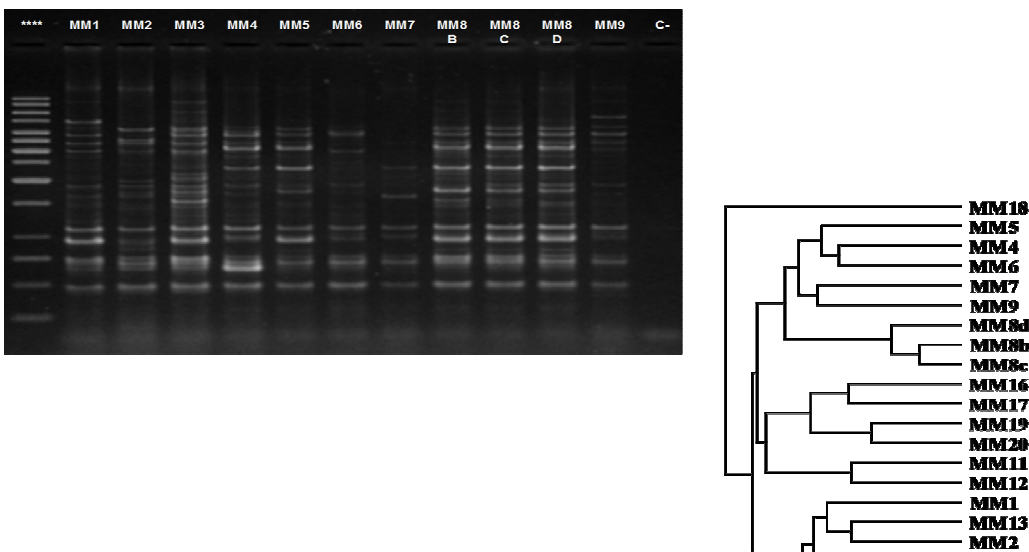


Figura 46: Gel de electroforese e respectivo dendograma, resultante da amplificação por ERIC-PCR, referente às estirpes de *Sinorhizobium* isoladas da cultivar Coussouls. ***= Marcador de pesos moleculares de 1kb (10000 -250 pb) C- = controlo negativo (sem DNA).

Através da observação do gel da Figura 46 e respectivo dendograma, verifica-se a existência de 5 grupos quando se considera uma percentagem de semelhança de 70%. Destaca-se ainda, a existência de dois pequenos grupos o primeiro constituído pelas estirpes C14 e C14a e o segundo pelas estirpes C8 e C9, com uma percentagem de semelhança acima de 90%



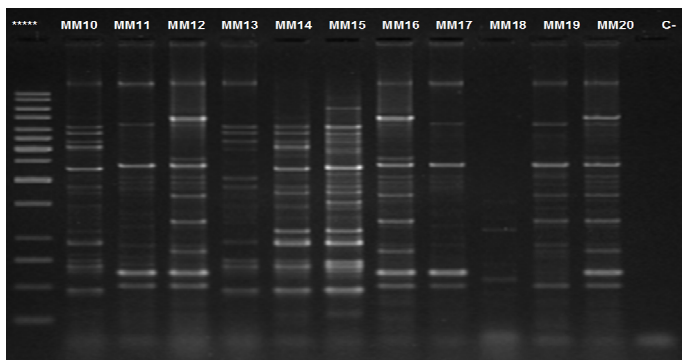


Figura 47: Géis de electroforese e respectivo dendograma, resultante da amplificação por ERIC-PCR, referente às estirpes de *Sinorhizobium* isoladas da cultivar Mamuntanas. ***= Marcador de pesos moleculares de 1kb (10000 -250 pb) C- = controlo negativo (sem DNA).

Através da observação dos géis da Figura 47 e respectivo dendograma, verifica-se a existência de 6 grupos quando se considera a percentagem de semelhança de 70%. Destaca-se ainda, a existência dum pequeno grupo constituído pelas estirpes MM8b, MM8c, MM8d com uma percentagem de semelhança de cerca de 85%

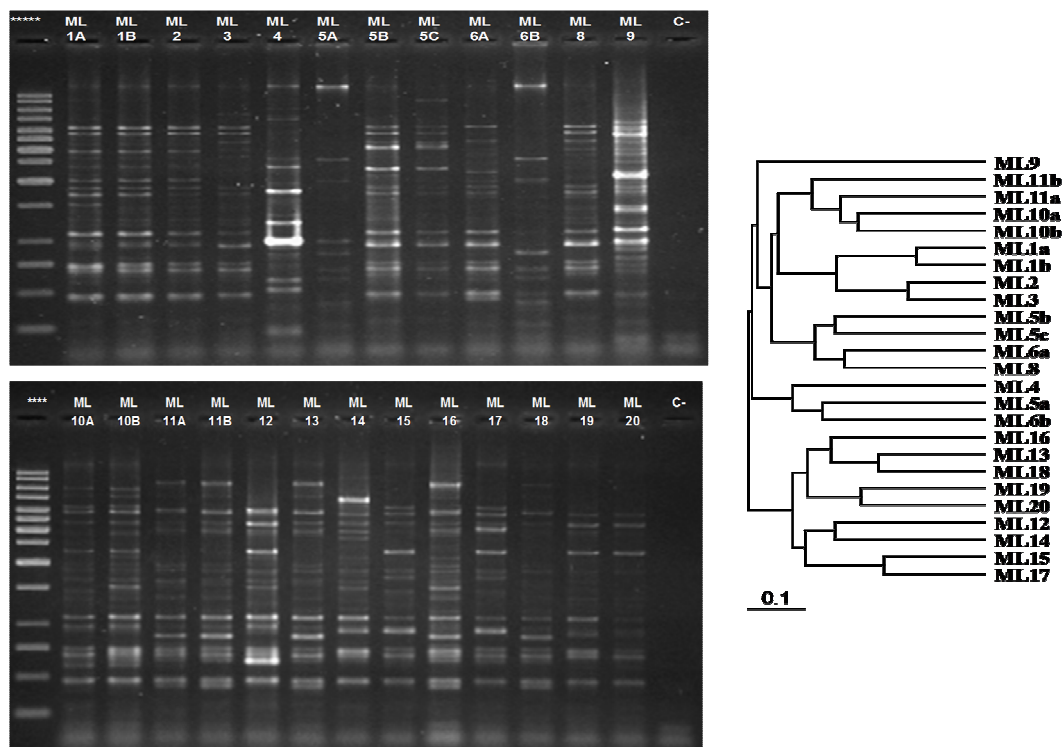


Figura 48: Géis de electroforese e respectivo dendograma, resultante da amplificação por ERIC-PCR, referente às estirpes de *Sinorhizobium* isoladas da cultivar Melissa. ***= Marcador de pesos moleculares de 1kb (10000 -250 pb) C- = controlo negativo (sem DNA).

Na Figura 48, pode-se observar nos géis de electroforese que os perfis das estirpes possuem um grande número de bandas, denotando-se uma grande diversidade entre as estirpes. Estas observações foram confirmadas pelo dendograma onde se verificou a existência de 6 grupos ao nível de 70% de semelhança. Um destes grupos, está subdividido em dois com níveis de semelhança de cerca de 90%, designadamente, o subgrupo formado por ML1a e ML1b e o subgrupo ML2 e ML3.

3.4.4. 16S rDNA

Na Figura 49 encontra-se um exemplo dos resultados de um gel de electroforese referentes à amplificação do gene de 16S rDNA para as estirpes de *Sinorhizobium*. Os restantes géis encontram-se em Anexo (Figura 66 à Figura 70). Nos géis pode observar-se a presença esperada de uma banda com cerca de 1500 pb. Com excepção das estirpes Mamuntanas 7 (Anexo, Figura 66), Magali 13 (Anexo, Figura 69), Coussouls 11 (Anexo, Figura 70).

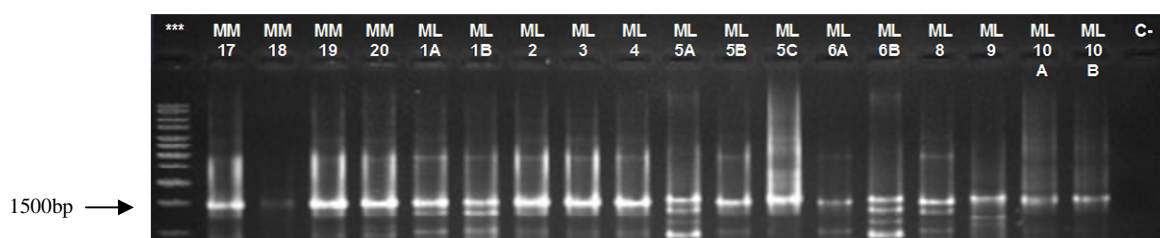


Figura 49: Gel electroforese de 16S rDNA, Resultados referentes às estirpes de *Sinorhizobium* isoladas de Mamuntanas (MM17- MM20) e Melissa (ML1a – ML10b); ***: marcador de 1000 pb; C-: controlo negativo.

3.4.5. Utilização da enzima *RsaI*

Nas figuras seguintes (Figura 50 à 55) encontram-se os resultados referentes aos RFLP (com a enzima *RsaI*) dos produtos de PCR do gene 16S rDNA. A observação dos perfis de restrição dos produtos amplificados obtidos para cada uma das estirpes e posterior determinação dos pesos moleculares correspondentes às bandas esperadas, (820 pb e de

700 pb) (Figura 4, página 29) permitiu a identificação da maioria das estirpes e a sua distinção entre *S. meliloti* e *S. medicae*. No entanto, para algumas estirpes o perfil de restrição com *RsaI* não coincidiu com os perfis esperados e por isso essas estirpes foram consideradas como não identificáveis.

Das 107 estirpes isoladas, 73 foram identificadas como *S. medicae*, 18 como *S. meliloti* e 16 não identificáveis (ver Tabela 7).

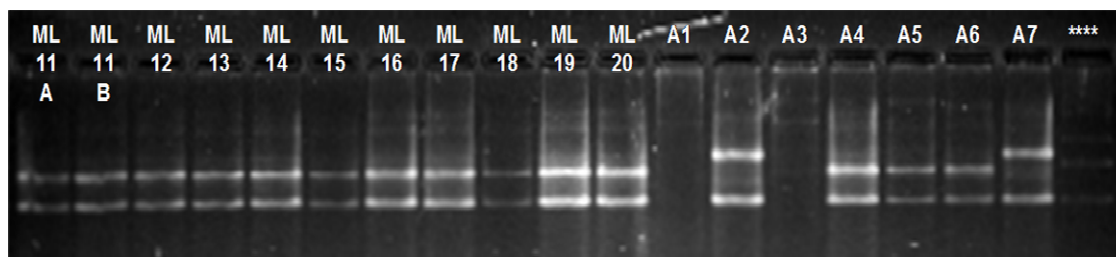


Figura 50: Resultados de RFLP do gene 16S rDNA com a enzima de restrição *RsaI*, para as estirpes de *Sinorhizobium* isoladas de Melissa (ML11a – ML20) e ABT (A1 – A7); ***= marcador 1000 pb.

Da Figura 50, podemos identificar como *S. meliloti* as estirpes A2 e A7. As restantes estirpes são identificáveis como sendo *S. medicae*, à excepção das estirpes A1 e A3 para as quais não se obtiveram perfis de restrição.

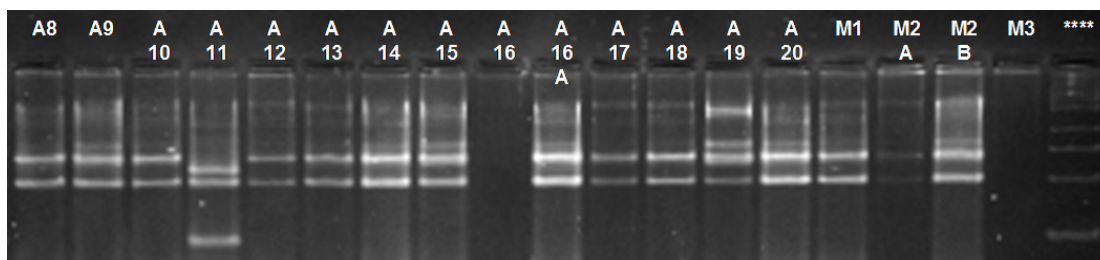


Figura 51: Resultados de RFLP de 16S rDNA com a enzima de restrição *RsaI*, para as estirpes de *Sinorhizobium* isoladas de ABT (A8- A20) e Magali (M1 – M3); ****= marcador 1000 pb.

Observando a Figura 51, podemos identificar como sendo *S. medicae* todas as estirpes com a exceção de A11 (não identificável) e A16 e M3, para as quais não se obtiveram perfis de restrição.

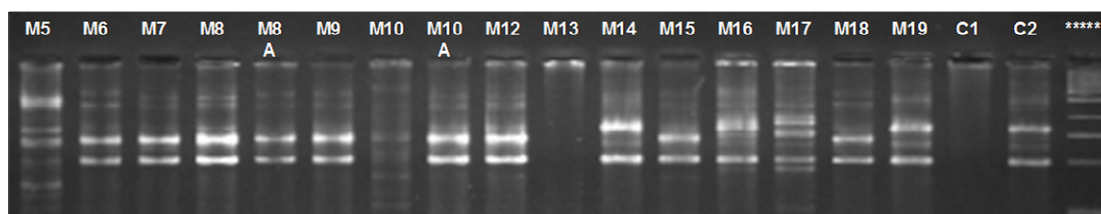


Figura 52: Resultados de RFLP de 16S rDNA com enzima *RsaI*, para Magali (M5- M19) e para as estirpes de *Sinorhizobium* isoladas de Coussouls (C1 e C2); ***= marcador 1000 pb.

Observando a Figura 52, podemos identificar como sendo *S. meliloti* as estirpes M14, M16 e M19, sendo as restantes identificadas como sendo *S. medicae*, à exceção das estirpes M10, M13 e C1 para as quais não se obtiveram perfis de restrição.

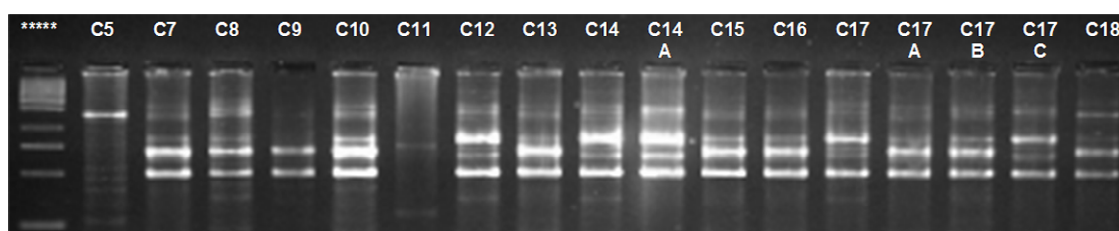


Figura 53: Resultados de RFLP de 16S rDNA com enzima *RsaI*, para as estirpes de *Sinorhizobium* isoladas de Coussouls (C5- C18); ***= marcador 1000 pb.

Observando a Figura 53, podemos identificar como sendo *S. meliloti* as estirpes C12, C14, C14a, C17 e C17c. As restantes são identificadas como *S. medicae* com a exceção das estirpes C5 e C11 que não foram possíveis de identificar.

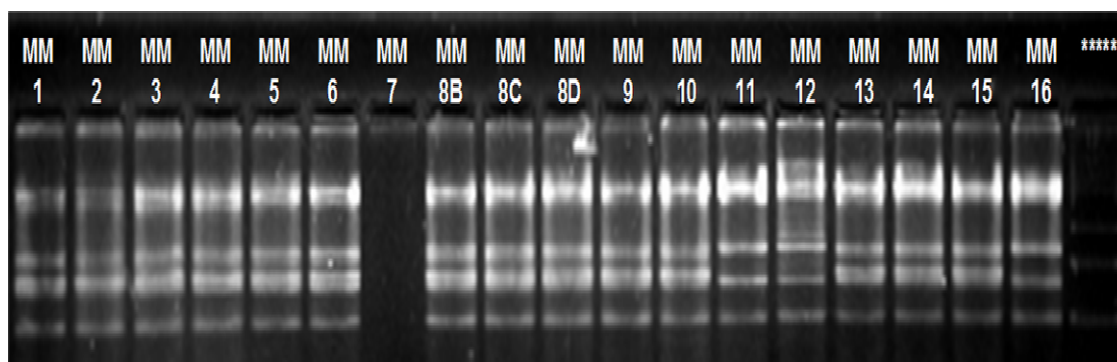


Figura 54: Resultados de RFLP de 16S rDNA com a enzima de restrição *RsaI*, para as estirpes de *Sinorhizobium* isoladas de Mamuntanas (MM1- MM16); ***= marcador 1000 pb.

Da Figura 54, podemos identificar as estirpes MM11, MM12 e MM16 como *S. meliloti*, sendo as restantes *S. medicae*.

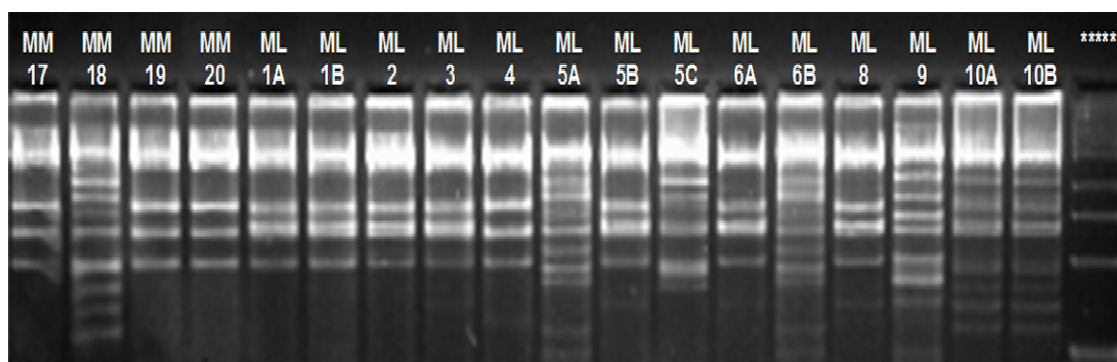


Figura 55: Resultados de RFLP de 16S rDNA com a enzima de restrição *RsaI*, para as estirpes de *Sinorhizobium* isoladas de Mamuntanas (MM17- MM20) e Melissa (ML1a- ML10b); ***= marcador 1000 pb.

Da Figura 55, foram identificadas como *S. meliloti* as estirpes MM17, MM19, MM20 e ML4, ficando por identificar as estirpes MM18, ML5a, ML5c, ML6b e ML9 por excesso de bandas. Sendo as restantes identificadas como sendo *S. medicae*.

Tabela 7: Resultados da identificação com a utilização da enzima de restrição *RsaI*.

Cultivar ABT		Cultivar Coussouls		Cultivar Magali		Cultivar Mamuntanas		Cultivar Melissa	
Estirpes	Identificação	Estirpes	Identificação	Estirpes	Identificação	Estirpes	Identificação	Estirpes	Identificação
A1	X	C1	<i>S. medicae</i>	M1	<i>S. medicae</i>	MM1	<i>S. medicae</i>	ML1A	<i>S. medicae</i>
A2	<i>S. meliloti</i>	C2	<i>S. meliloti</i>	M2a	<i>S. medicae</i>	MM2	<i>S. medicae</i>	ML1B	<i>S. medicae</i>
A3	X	C5	X	M2b	<i>S. medicae</i>	MM3	<i>S. medicae</i>	ML2	<i>S. medicae</i>
A4	<i>S. medicae</i>	C7	<i>S. medicae</i>	M3	X	MM4	<i>S. medicae</i>	ML3	<i>S. medicae</i>
A5	<i>S. medicae</i>	C8	<i>S. medicae</i>	M5	X	MM5	<i>S. medicae</i>	ML4	<i>S. meliloti</i>
A6	<i>S. medicae</i>	C9	<i>S. medicae</i>	M6	<i>S. medicae</i>	MM6	<i>S. medicae</i>	ML5a	X
A7	<i>S. meliloti</i>	C10	<i>S. medicae</i>	M7	<i>S. medicae</i>	MM7	<i>S. medicae</i>	ML5b	<i>S. medicae</i>
A8	<i>S. medicae</i>	C11	X	M8	<i>S. medicae</i>	MM8b	<i>S. medicae</i>	ML5c	X
A9	<i>S. medicae</i>	C12	<i>S. meliloti</i>	M8a	<i>S. medicae</i>	MM8c	<i>S. medicae</i>	ML6a	<i>S. medicae</i>
A10	<i>S. medicae</i>	C13	<i>S. medicae</i>	M9	<i>S. medicae</i>	MM8d	<i>S. medicae</i>	ML6b	X
A11	X	C14	<i>S. meliloti</i>	M10	X	MM9	<i>S. medicae</i>	ML8	<i>S. medicae</i>
A12	<i>S. medicae</i>	C14a	<i>S. meliloti</i>	M10a	<i>S. medicae</i>	MM10	<i>S. medicae</i>	ML9	X
A13	<i>S. medicae</i>	C15	<i>S. medicae</i>	M12	<i>S. medicae</i>	MM11	<i>S. meliloti</i>	ML10a	<i>S. medicae</i>
A14	<i>S. medicae</i>	C16	<i>S. medicae</i>	M13	X	MM12	<i>S. meliloti</i>	ML10b	<i>S. medicae</i>
A15	<i>S. medicae</i>	C17	<i>S. meliloti</i>	M14	<i>S. meliloti</i>	MM13	<i>S. medicae</i>	ML11a	<i>S. medicae</i>
A16	X	C17a	<i>S. medicae</i>	M15	<i>S. medicae</i>	MM14	<i>S. medicae</i>	ML11b	<i>S. medicae</i>
A16a	<i>S. medicae</i>	C17b	<i>S. medicae</i>	M16	<i>S. meliloti</i>	MM15	<i>S. medicae</i>	ML12	<i>S. medicae</i>
A17	<i>S. medicae</i>	C17c	<i>S. meliloti</i>	M17	X	MM16	<i>S. meliloti</i>	ML13	<i>S. medicae</i>
A18	<i>S. medicae</i>	C18	<i>S. medicae</i>	M18	<i>S. medicae</i>	MM17	<i>S. meliloti</i>	ML14	<i>S. medicae</i>
A19	<i>S. medicae</i>			M19	<i>S. meliloti</i>	MM18	X	ML15	<i>S. medicae</i>
A20	<i>S. medicae</i>					MM19	<i>S. meliloti</i>	ML16	<i>S. medicae</i>
						MM20	<i>S. meliloti</i>	ML17	<i>S. medicae</i>
								ML18	<i>S. medicae</i>
								ML19	<i>S. medicae</i>
								ML20	<i>S. medicae</i>

X= não identificáveis.

3.4.6. NodC

Nas figuras seguintes (Figuras 56 a 61) encontram-se as electroforeses com os resultados da amplificação do gene NodC, onde é esperada a presença da banda de cerca de 930 pb.

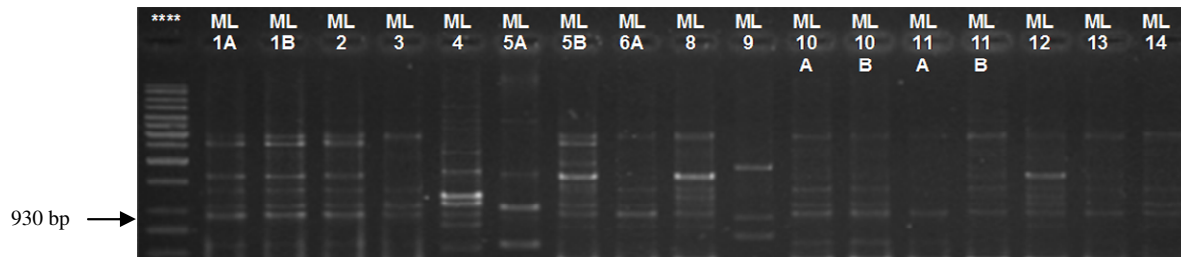


Figura 56: Resultados referentes a nodC – PCR, para as estirpes de *Sinorhizobium* isoladas de Melissa (ML1a – ML14) ; ****= Marcador 1000 pb; C- = controlo negativo.

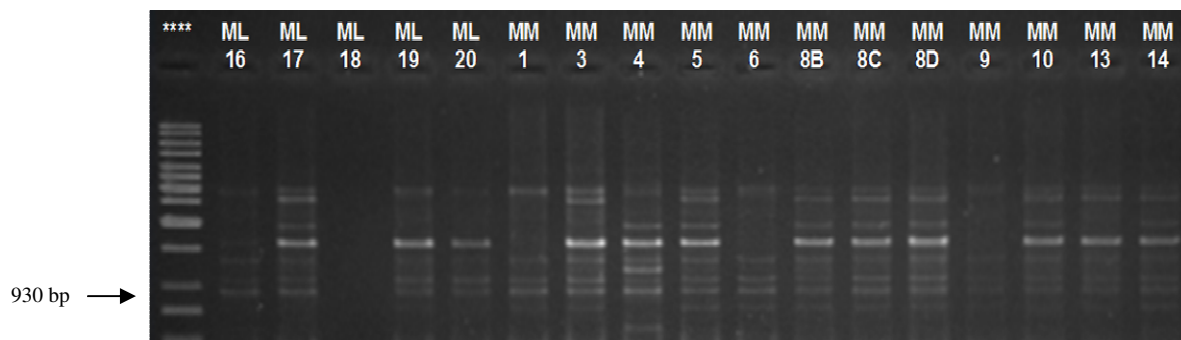


Figura 57: Resultados referentes a nodC – PCR, para as estirpes de *Sinorhizobium* isoladas de Melissa (ML16 – ML20) e Mamuntanas (MM1 – MM14) ; ****= Marcador 1000 pb; C- = controlo negativo.

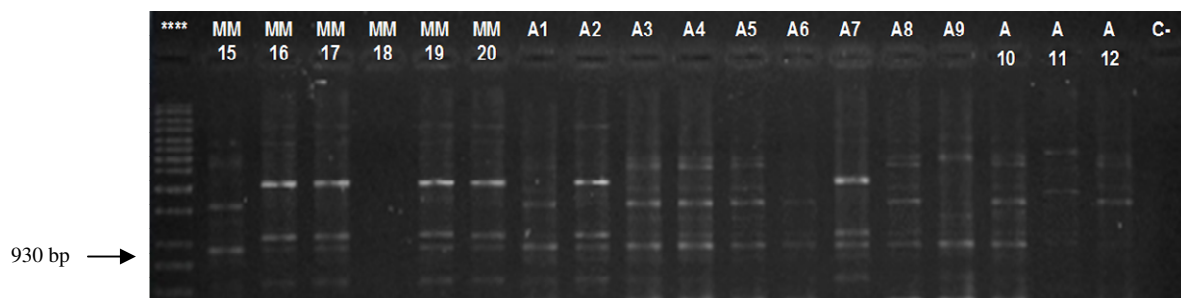


Figura 58: Resultados referentes a nodC – PCR, para as estirpes de *Sinorhizobium* isoladas de Mamuntanas (MM15 – MM20) e ABT (A1 – A12) ; ****= Marcador 1000 pb; C- = controlo negativo.

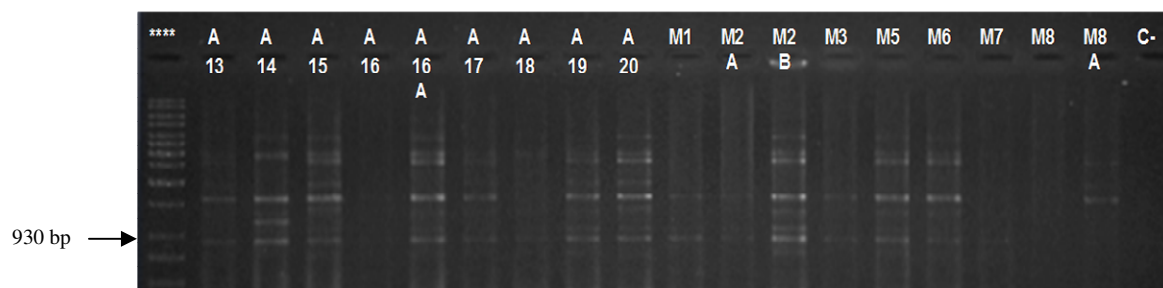


Figura 59: Resultados referentes a nodC – PCR, para as estirpes de *Sinorhizobium* isoladas de ABT (A13 – A20) e Magali (M1 –M8a); ***= Marcador 1000 pb; C- = controlo negativo.

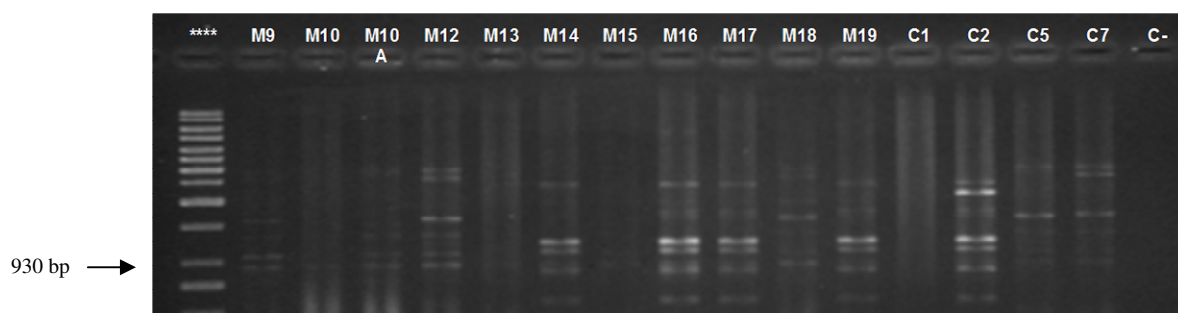


Figura 60: Resultados referentes a nodC – PCR, para as estirpes de *Sinorhizobium* isoladas de Magali (M9 – M19) e Coussouls (C1 – C7) ; ***= Marcador 1000 pb; C- = controlo negativo.

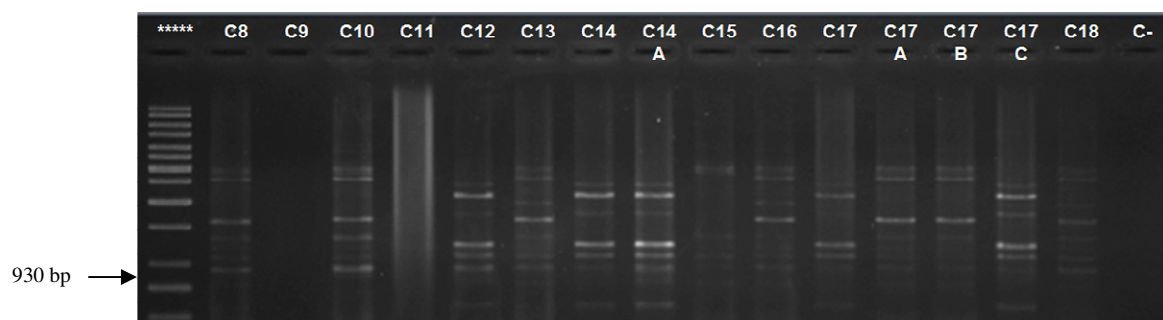


Figura 61: Resultados referentes a nodC – PCR, para as estirpes de *Sinorhizobium* isoladas de Coussouls (C8 – C18); ***= Marcador 1000 pb; C- = controlo negativo.

Para todas as estirpes foi observada a presença da banda esperada (cerca de 930 pb), excepto para: ML5c; ML6b; ML15; ML18; MM7; MM18; A11; A16; M8; M8a; C1; C9; C11; C15.

3.4.7. Conjugação dos resultados obtidos por REP-PCR, ERIC-PCR, *RsaI* e relação com a eficácia simbiótica e tolerância à temperatura e salinidade

Na Figura 62 estão representados separadamente os dendogramas de semelhança genética das estirpes de *Sinorhizobium*, de cada cultivar de origem, baseados nos dados obtidos por REP-PCR e ERIC PCR.

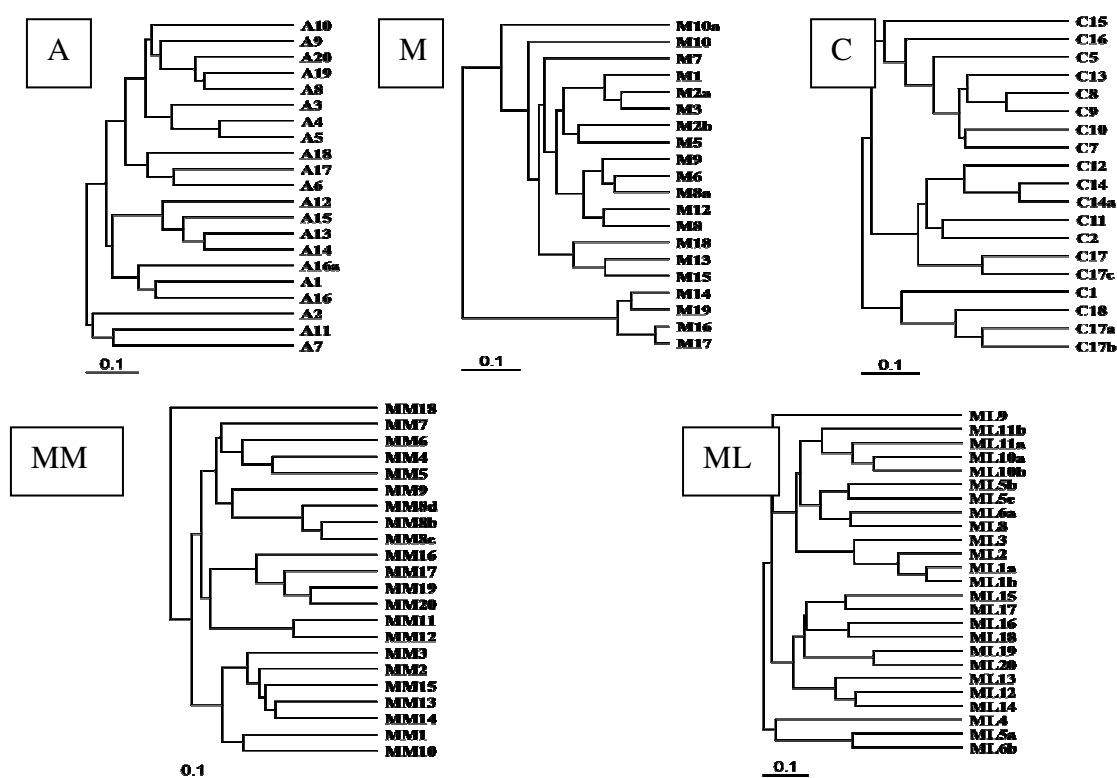


Figura 62: Dendogramas obtidos após a análise em conjunto, dos resultados de REP e ERIC PCR, mostrando as relações genéticas existentes entre as estirpes de cada cultivar. A- cultivar ABT; M- cultivar Magali; C- cultivar Coussouls; MM – cultivar Mamuntanas; ML- cultivar Melissa.

Comparando os dendogramas da Figura 62 com os anteriores é possível agrupar as estirpes em grupos de semelhança mais definidos, com maior fiabilidade de resultados e diminuindo a possibilidade de falsas semelhanças. Assim, foi possível obter uma separação nítida em 4 grupos para a cultivar Magali; esta separação foi possível de identificar utilizando apenas a técnica de REP-PCR; as estirpes identificadas como *S. meliloti* (M14, M16 e M19) encontram-se num mesmo grupo, juntamente com uma estirpe não identificada (M17), separado das restantes. Para as estirpes isoladas da cultivar ABT é possível observar que estas se agrupam em pelo menos 6 grupos,

encontrando-se as estirpes de *S. meliloti* (A2 e A7) num único grupo, juntamente com uma estirpe que não foi identificada (A11). No caso das estirpes isoladas da cultivar Coussouls observam-se 3 grandes grupos principais formados a um nível de semelhança mais baixo do que para as outras cultivares, encontrando-se as estirpes identificadas como *S. meliloti* (C2, C12, C14, C14a, C17 e C17c) no grupo central. Para as estirpes pertencentes às cultivares Mamuntanas e Melissa há a formação de 6 e 7 grupos respectivamente, com as estirpes *S. meliloti* (MM 11, MM12, MM16, MM17, MM19, MM20 e ML4) isoladas em grupos distintos das *S. medicae*.

No dendograma da Figura 63 é possível observar a separação das estirpes em 11 grupos principais, dos quais ainda se pode subdividir o grupo X em dois subgrupos (a) e (b) separando assim as estirpes *S. medicae* das *S. meliloti* respectivamente. Verifica-se também que as estirpes foram agrupadas consoante o seu hospedeiro (neste caso por cultivar) de origem (Tabela 8). As estirpes anteriormente identificadas como *S. meliloti* encontram-se distribuídas pelos grupos V e X(b), formando assim 2 grandes grupos distintos das estirpes identificadas como *S. medicae*.

Comparando a Figura 64 onde se podem ver os resultados de peso seco com as duas espécies de hospedeiros, para as estirpes identificadas com a Tabela 9 onde se encontra resumida a relação dos grupos de semelhança com as características de eficácia, tolerância à temperatura e salinidade. Pode-se constatar que relativamente à eficácia simbiótica (ESR) com *M. polymorpha* todas as estirpes pertencentes aos grupos VII e X(b), obtiveram valores inferiores a 10% sendo nestes grupos onde se encontram as estirpes com menores valores de peso seco com esta espécie. Por outro lado, os grupos onde se encontram as estirpes que obtiveram valores mais elevados, de peso seco com *M. polymorpha*, são os grupos I, IV, VI, VIII, IX e X(a). Quando se utilizou como planta hospedeira *M. sativa*, os grupos onde se encontram as estirpes com menores valores de peso seco, são respectivamente II, III, IV, V, VI e VII, sendo os grupos VIII, IX e X(a), os que correspondem às estirpes com peso seco mais elevado. Podemos constatar que com as duas espécies de plantas as estirpes que obtiveram maiores valores de peso seco e consequentemente ESR mais elevadas pertencem aos grupos VIII, IX e X(a), que são grupos constituídos principalmente por estirpes isoladas das cultivares

Melissa e Mamuntanas. Relativamente aos valores de tolerância à temperatura podemos observar que praticamente todas as estirpes obtiveram valores de tolerância a 32°C maiores que 80%, excepto 5 estirpes (ML9, ML10a, ML11b, ML16 e ML18). As estirpes dos grupos I, III e VII mostraram ser mais sensíveis à temperatura de 36°C, não conseguindo valores acima de 80%. No entanto, é no grupo I onde se encontram o maior número de estirpes sensíveis à temperatura de 36°C e de 40°C. Apenas duas estirpes toleraram a temperatura de 42°C, Coussouls 14^a (grupo V) identificada como *S. meliloti* e Melissa 5c (grupo VIII) que não foi identificada embora esteja englobada num grupo com estirpes identificadas como sendo *S. medicae*, onde se encontram o maior número de estirpes tolerantes à temperatura de 40°C.

Nos resultados de tolerância à salinidade, todas as estirpes obtiveram valores acima de 80% em relação ao controlo até à concentração de 100 mM de NaCl, com excepção de uma que apenas conseguiu exceder esse valor para concentração de 20 mM (ML6b). Os grupos VIII, IX e X(b) são os que possuem maior número de estirpes tolerantes a 500 mM. Apenas 9 estirpes toleraram a concentração de NaCl de 1M, 6 encontram-se no grupo VIII, duas no grupo X(b) e uma no grupo VI. Sendo no grupo VIII onde se localiza a estirpe Melissa 5c, capaz de tolerar a temperatura de 40°C e 1M de NaCl.

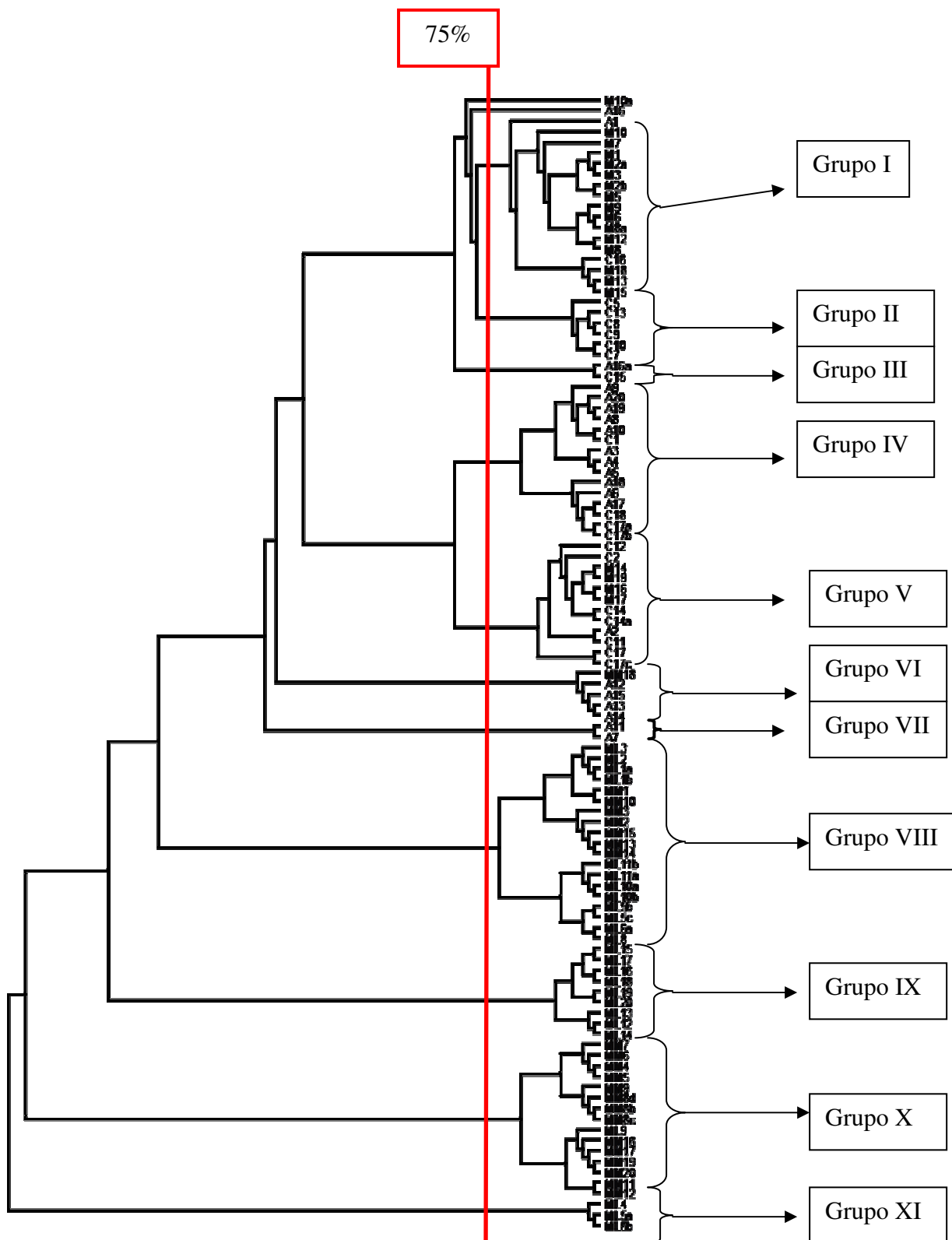


Figura 63: Dendograma obtido com os resultados de REP-PCR e ERIC-PCR conjugados, mostrando as semelhanças genéticas. Estão representados os grupos obtidos a 75% de semelhança, assinalados de I a XI.

Tabela 8: Distribuição das estirpes pelos grupos.

Grupo		Estirpes
I		15 Estirpes pertencentes à cultivar Magali (M10, M7, M1, M2a, M3, M2b, M5, M9, M6, M8a, M12, M8, M18, M13, M15), 1 pertencente à cultivar ABT (A1) e 1 pertencente à cultivar Coussouls (C16)
II		6 Estirpes pertencentes à cultivar Coussouls (C5, C13, C8, C9, C10, C7)
III		1 Estirpe pertencente à cultivar ABT (A16) e 1 pertencente à cultivar Coussouls (C15)
IV		11 Estirpes pertencentes à cultivar ABT (A9, A20, A19, A8, A10, A3, A4, A5, A18, A6, A17) e 4 pertencentes à cultivar Coussouls (C1, C18, C17a, C17b)
V		7 Estirpes pertencentes à cultivar Coussouls (C12, C2, C14, C14a, C11, C17, C17c) e 4 pertencentes à cultivar Magali (M14, M19, M16, M17)
VI		4 Estirpes pertencentes à cultivar ABT (A12, A15, A13, A14) e 1 pertencente à cultivar Mamuntanas (MM18)
VII		2 Estirpes pertencentes à cultivar ABT (A11 e A7)
VIII		12 Estirpes pertencentes à cultivar Melissa (ML3, ML2, ML1a, ML1b, ML11b, ML11a, ML10a, ML10b, ML5b, ML5c, ML6a, ML8) e 7 estirpes pertencentes à cultivar Mamuntanas (MM1, MM10, MM3, MM2, MM15, MM13, MM14)
IX		9 Estirpes pertencentes à cultivar Melissa (ML15, ML17, ML16, ML18, ML19, ML20, ML13, ML12, ML14)
X	(a)	8 Estirpes pertencentes à cultivar Mamuntanas (MM7, MM6, MM4, MM5, MM9, MM8b, MM8c, MM8d)
	(b)	6 Estirpes pertencentes à cultivar Mamuntanas (MM16, MM17, MM19, MM20, MM11 e MM12) e 1 pertencente à cultivar Melissa (ML9)
XI		3 Estirpes pertencentes à cultivar Melissa (ML4, ML5a, ML6b)

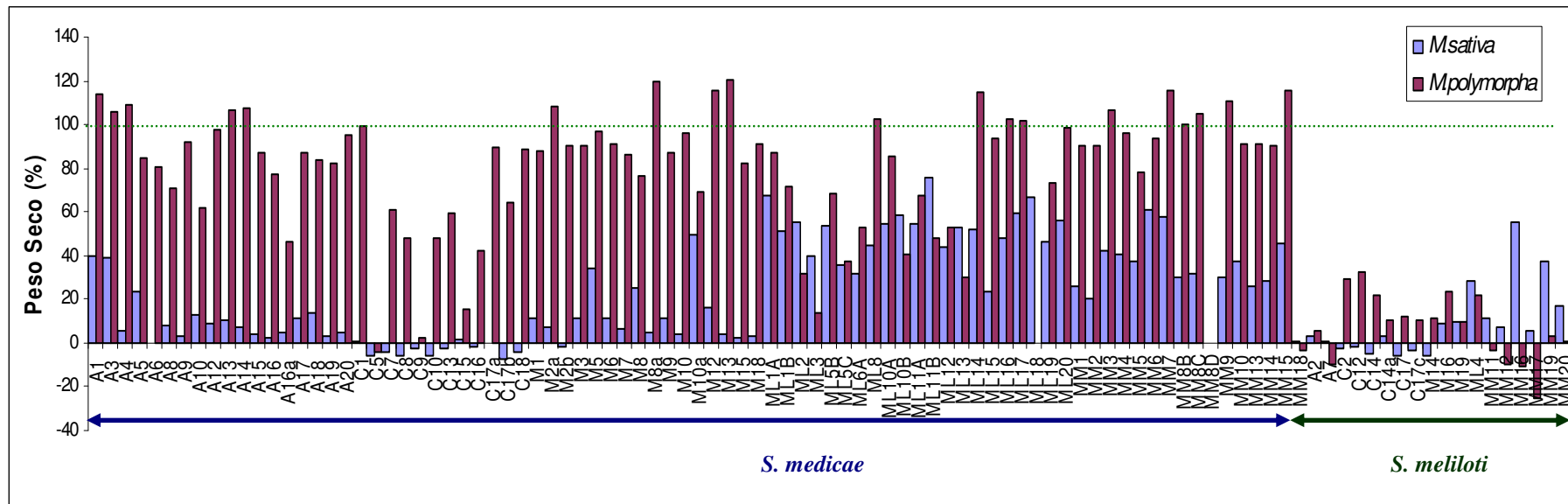


Figura 64: Valores de peso seco da parte aérea das plantas de *M. sativa* e *M. polymorpha*, referentes aos resultados obtidos para as estirpes das 5 cultivares: A= cultivar ABT; M= cultivar Magali; C= cultivar Coussouls; MM= cultivar Mamuntanas; ML= cultivar Melissa. TN=100%; T0=0%. (Anexo,

Tabela 20, 21, 22, 23 e 24). Apenas a ML5c não se encontra identificada.

Tabela 9: Diferenciação entre características exibidas pelas 107 estirpes de *Sinorhizobium*; ESR= ((Média (peso seco) – T0)*100)/(TN – T0); +, todas as estirpes positivas; -, todas as estirpes negativas.

Características	Grupo												
	I (n=17)	II (n=6)	III (n=2)	IV (n=15)	V (n=12)	VI (n=5)	VII (n=2)	VIII (n=19)	IX (n=9)	X (n=15)		XI (n=3)	Restantes (n=2)
										X(a) (n=8)	X(b) (n=7)		
Eficiência Simbiótica Relativa (ESR)													
<i>M. polymorpha</i>													
≤10%	-	2	-	-	1	1	+	-	1	-	+	1	-
11 – 40%	-	-	1	-	11	-	-	4	1	-	-	2	-
41 – 80%	2	4	1	3	-	-	-	5	2	1	-	-	+
81% - TN	10	-	-	9	-	2	-	7	2	2	-	-	-
>TN	5	-	-	3	-	2	-	3	3	4	-	-	-
<i>M. sativa</i>													
≤10%	9	+	+	10	10	4	+	-	-	-	3	2	1
11 – 40%	8	-	-	5	2	1	-	8	1	4	3	1	-
41 – 80%	-	-	-	-	-	-	-	10	6	3	1	-	1
81% - TN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
>TN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tolerância à Temperatura													
32°C (≥80%)	+	+	+	+	+	+	+	17	7	+	6	+	+
36°C (≥80%)	-	2	-	2	4	2	-	17	+	+	6	1	-
40°C (≥80%)	1	4	+	2	9	2	1	10	5	5	5	1	+
42°C	-	-	-	-	1	-	-	1	-	-	-	-	-
Tolerância a NaCl													
20 mM (≥80%)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
100 mM (≥80%)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	2	+
500 mM (≥80%)	7	1	1	7	6	1	1	18	8	6	+	1	-
1000 mM	-	-	-	-	-	1	-	6	-	-	2	-	-

4. DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

Hoje em dia, os solos estão cada vez mais susceptíveis à degradação quer por problemas ambientais naturais, como o aumento da temperatura global, quer por causas humanas como a poluição. Assim os problemas causados pela acidificação de terrenos, temperaturas altas ou salinidade elevada impõem enormes dificuldades à fixação de N₂ e crescimento de culturas. A fertilização mineral em terrenos pobres em azoto é outra das preocupações que enfrentam hoje os agricultores e ambientalistas, devido ao seu efeito contaminante nos terrenos e águas subterrâneas e também pelos custos elevados. Assim, uma alternativa viável à fertilização química, é a fixação biológica de azoto, por parte das leguminosas com os seus simbioses (Oliveira et al., 2004), sendo as leguminosas como a luzerna consideradas muito importantes, quer para os sistemas culturais quer para a produção animal (Denton et al., 2006). Deste modo, a procura de estirpes de rizóbio que confirmem maior resistência, e aumentem a produção das culturas de leguminosas, em solos, sujeitos a altas temperaturas ou salinidade, torna-se extremamente importante.

Por isso, o objectivo deste trabalho foi caracterizar ao nível morfológico, fisiológico e molecular uma população de rizóbios isolada de várias cultivares de luzerna perene (*Medicago sativa*), dum solo do Alentejo tendo em vista a sua futura utilização como inoculante de luzernas em zonas afectadas por condições ambientais extremas (temperatura e salinidade).

Neste estudo, os solos onde crescem as plantas de *Medicago sativa* que serviram para isolar as estirpes de *Sinorhizobium*, pertencem a uma zona onde as espécies nativas de *Medicago* são espécies anuais (como *M. polymorpha*), sendo as perenes (como *M. sativa*) espécies introduzidas no âmbito da produção agrícola. Este facto pode explicar os resultados obtidos que mostram a existência de uma população com um maior número de estirpes, identificadas como *S. medicae*, em relação à espécie *S. meliloti*.

O recurso à utilização da enzima de restrição *RsaI* na digestão dos produtos amplificados do 16S rDNA, permitiu a distinção entre as duas espécies de *Sinorhizobium*: *medicae* e *meliloti*, que são geneticamente muito próximas. Com a utilização desta técnica, descrita por vários autores (Zibri et al., 2005, Biondi et al., 2003), foi possível identificar 73 estirpes como *S. medicae* e 18 como *S. meliloti*. No

entanto, algumas das estirpes não conseguiram ser identificadas por este método e por isso irão ser sujeitas a sequenciação.

As estirpes de *Sinorhizobium* foram também caracterizadas quanto à sua capacidade de nodulação e eficácia de fixação de azoto com *Medicago sativa* e *Medicago polymorpha*, tendo-se verificado a existência de algumas estirpes altamente eficazes com este último hospedeiro, tal como se pode verificar na Figura 64 onde, se mostram os resultados obtidos de eficiência simbiótica relativa (ESR) com estes dois hospedeiros. De facto, os resultados de ESR com *M. polymorpha*, demonstram a capacidade das estirpes de *S. medicae* para nodular esta espécie, tendo-se obtido valores de ESR elevados, em oposição aos resultados obtidos com as estirpes de *S. meliloti*, tal como foi anteriormente confirmado por outros autores (Béna *et al.* 2005; Brunel *et al.*, 1996; Sadowsky & Graham, 1998). Por outro lado, a capacidade de *M. sativa* ser nodulada pelas estirpes de *S. medicae* foi confirmada neste trabalho, apesar da especificidade ser, segundo vários autores, mais elevada com *S. meliloti* (Paffetti *et al.*, 1998; Roumiantseva *et al.*, 2002; Velázquez *et al.*, 1999). Porém, os resultados obtidos com *S. meliloti* apontam para valores de ESR médios e muito inferiores aos do controlo com azoto (100%).

Relativamente às condições de stresse ambiental estudadas, verificou-se sempre a existência de estirpes tolerantes. Nos ensaios de tolerância à temperatura de 40°C as estirpes mais tolerantes corresponderam a estirpes de *S. medicae* da cultivar Melissa, designadamente ML10b, ML10a, ML6a e ML11a. Porém, a 42°C, apenas duas estirpes Melissa 5c e Coussouls 14ª conseguiram sobreviver a esta temperatura.

Nos ensaios de tolerância à salinidade, as estirpes mais tolerantes à concentração de 500 mM de NaCl foram também as estirpes pertencentes à cultivar Melissa. Para a concentração de 1 M obtiveram-se 9 estirpes tolerantes, a maioria pertencentes às cultivares Melissa e Mamuntanas.

Porém, não se obteve uma estirpe capaz de tolerar todas as condições ambientais impostas e que simultaneamente fosse muito eficaz na fixação de azoto com as duas espécies de *Medicago*. Assim, apenas a estirpe Melissa 5c, tolerou em simultâneo a temperatura de 40°C e 1M de NaCl, embora apresente valores médios para a fixação de azoto com os dois hospedeiros, que correspondem a 35,8% para *M. sativa* e 37,5% para *M. polymorpha*.

Analisando os diferentes padrões de bandas obtidos por REP-PCR e ERIC-PCR para cada uma das estirpes, verificou-se a existência de vários grupos de semelhança (I-XI), indicando uma alta diversidade genética entre a população de *Sinorhizobium* estudada, reunindo-se num mesmo grupo as estirpes isoladas da mesma cultivar. Estes resultados mostram a influência da planta hospedeira na diversidade rizobiana encontrada, confirmando os resultados obtidos por Paffetti *et al.* (1998), que após analisar uma população de *S. meliloti* isolada de diferentes solos e localizações geográficas, com recurso a diferentes variedades de *M. sativa*, chegou à conclusão que a planta hospedeira é o factor mais importante afectando a diversidade genética da população analisada. Verificou-se também que as estirpes identificadas como *S. meliloti* estavam reunidas em grupos distintos das *S. medicae*. Foi igualmente possível observar que as estirpes mais tolerantes à salinidade e à temperatura estavam agrupadas e associadas às cultivares Melissa e Mamuntanas.

Os resultados obtidos neste trabalho mostram a existência duma grande diversidade e de diferentes níveis de tolerância à temperatura e salinidade nas estirpes de *Sinorhizobium* da população estudada, demonstrando a importância e a necessidade de se efectuarem estes estudos quando se pretendem seleccionar estirpes com capacidades de fixar azoto em solos afectados por condições ambientais adversas como as existentes na bacia Mediterrânica (sul da Europa e norte de África).

5. BIBLIOGRAFIA

- Andrade, D.S., Hamakawa, P.J. 1994. Estimativa do número de células viáveis de rizóbio no solo e em inoculantes por infecção em plantas. In: Hungria, M., Araújo, R.S. (Eds.), Manual de Métodos Empregados em Estudos de Microbiologia Agrícola. Embrapa- SPI, Brasília, pp. 63–94.
- Antolín, M.C., Sánchez-Díaz, M. 1992. Photosynthetic nutrient use efficiency, nodule activity and solute accumulation in drought stressed leguminous plants, *Photosynthetica* 27:595-604.
- Arayankoon, T., Schomberg, H.H., Weaver, R.W. 1990. Nodulation and N₂ fixation of guar at high root temperature. *Plant & Soil*. 126:209-213.
- Asch, F., Dingkuhn, M., Wittstock, C., Doerffling, K. 1999. Sodium and potassium uptake of rice panicles as affected by salinity and season in relation to yield components. *Plant & Soil*. 207:133–145.
- Aziz A., Martin-Tanguy J., Larher F. (1999) Salt stress-induced proline accumulation and changes in tyramine and polyamine levels are linked to ionic adjustment in tomato leaf discs. *Plant Science*. 145:83–91.
- Bedmar, E.J., González, J., Lluch, C., Rodelas, B. 2006. Fijación de Nitrógeno: Fundamentos y Aplicaciones. Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno (SEFIN), Granada.
- Béna, G., Lyet, A., Huguet, T., Olivieri, I. 2005. *Medicago-Sinorhizobium* symbiotic specificity evolution and the geographic expansion of *Medicago*. *Journal of Evolutionary Biology*. 18:1547-1558.
- Bekki, A., Trinchant, J.C., Rigaud, J. 1987. Nitrogen fixation (C₂H₂ reduction) by *Medicago* nodules and legumes under sodium chloride stress. *Plant Physiology*. 71:61-67.
- Bergersen, F. 1965. Ammonia – An Early Stable Product of Nitrogen Fixation by Soybean Root Nodules. *Australian Journal of Biological Sciences*. 18:1 – 9.
- Beringer, J.E., Hirsch, P.R. 1984. Genetic adaptation to the environment. The role of plasmids in microbial ecology. In: Klug, M.J., Ready, C.A. (Eds.), *Current Perspectives in Microbial Ecology*, American Society for Microbiology. Washington, DC, pp. 63-70.
- Bernal, G., Graham, P.H. 2001. Diversity of rhizobia associated with *Phaseolus vulgaris* L. in Ecuador, and comparisons with Mexican bean rhizobia. *Canadian Journal of Microbiology*. 47:526–534.

- Biological nitrogen fixation: the global challenge & future needs. Lake Como, Italy: A position paper, discussed at The Rockefeller Foundation Bellagio Conference Centre, 1997. 83p.
- Biondi, E.G., Pilli, E., Giuntini, E., Roumiantseva, M.L., Andronov, E.E., Onichtchouk, O.P., Kurchak, O.N., Simarov, B.V., Dzyubenko, N.I., Mengoni, A., Bazzicalupo, M. 2003. Genetic relationship of *Sinorhizobium meliloti* and *Sinorhizobium medicae* strains isolated from Caucasian region. FEMS Microbiology Letters. 220:207-213.
- Brumfield, R., Beerli, T.P., Nickerson, D.A., Edwards, S.V. 2003. The utility of single nucleotide polymorphisms in inferences of population history. Trends in Ecology & Evolution. 18:249–256.
- Brunel, B., Rome, S., Ziani, R., Cleyet-Marel, J.C. 1996. Comparison of nucleotide diversity and symbiotic properties of *Rhizobium meliloti* populations from annual *Medicago* species. FEMS Microbiology and Ecology 19:71–82.
- Bloem, J.F., Botha, W.J., Law, I.J., Steyn, P.L. 2002. Colony variation in *Sinorhizobium meliloti* inoculant strain U 45. Microbiology Research. 157:283-292.
- Bohlool, B.B., Ladha, J.K., Garrity, D.P., George, T. 1992 Biological nitrogen fixation for sustainable agriculture: A perspective. Plant & Soil, Dordrecht, vol. 141, n.1, p.1-11.
- Caetano-Anollés, G., Gresshoff, P.M. 1997. DNA Markers Protocols, Applications, and Overviews. Wiley-Liss, Inc.
- Capela, D., Filipe, C., Bobik, C., Batut, J., Bruand, C. 2006. *Sinorhizobium meliloti* Differentiation During Symbiosis with Alfalfa: A Transcriptomic Dissection. MPMI. 19:363-372.
- Chen, L.S., Figueredo, A., Pedrosa, F.O., Hungria, M. 2000. Genetic characterization of soybean rhizobia in Paraguay. Applied and Environmental Microbiology. 66:5099–5103.
- Callaham, D. A., Torrey, J. G. 1981. The Structural Basis for Infection of Root Hairs of *Trifolium repens* by *Rhizobium*. Canadian Journal of Botany. 59:1647 – 1664.
- Castro, I.V. 2000. Efeitos ecotoxicológicos dos metais pesados na fixação biológica do azoto em solos contaminados industrialmente. Silva Lusitana. 8:165-194.

- Coenye, T., LiPuma, J.J. 2002. Multilocus restriction typing: a novel tool for studying global epidemiology of *Burkholderia cepacia* complex infection in cystic fibrosis. *Journal of Infectious Diseases*. 185:1454–1462.
- Cordovilla, M.P., Ligeró, F., Lluch, C. 1994. The effect of salinity on N₂ fixation and assimilation in *Vicia faba*. *Journal of Experimental Botany*. 45:1483-1488.
- Curtis, J., Shearer, G., Kohl, D.H. 2004. Bacteroid praline catabolism affects N₂ fixation rate of drought-stressed soybeans. *Plant Physiology*. 136:3313-3318.
- Dart, P.J., Mercer, F.V. 1965. The effect of growth temperature, level of ammonium nitrate and light intensity on the growth and nodulation of cowpea (*Vigna sinensis* Endl. Ex. Hassk.). *Australian Journal of Agriculture Research*. 16:321-345.
- De Bruijn, F. J., Downie, J. A. 1991. Biochemical and Molecular Studies of Symbiotic Nitrogen-Fixation. *Current Opinion in Biotechnology*. 2:184 – 192.
- De Bruijn, F.J. 1992. Use of repetitive (Repetitive Extragenic Palindromic and Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 58:2180-2187.
- Delgado, M.J., Garrido, J.M., Ligeró, F., Lluch, C. 1993. Nitrogen fixation and carbon metabolism by nodules and uzernas es of pea plants under sodium chloride stress. *Physiologia Plantarum*. 89:824–829
- Denison, R.F., Hunt, S., Layzell, D.B. 1992. Nitrogenase activity, nodule respiration and O₂ permeability following detopping of uzernas and birdsfoot trefoil. *Plant Physiology*. 98:894-900.
- Denton, M.D., Hill, C.R., Bellotti, W.D., Coventry, D.R. 2006. Nodulation of *Medicago truncatula* and *Medicago polymorpha* in two pastures of contrasting soil pH and rhizobial populations. *Applied Soil Ecology* 35:441-448.
- Döbereiner, J., 1992. Recent changes in concepts of plant bacteria interactions: Endophytic N₂ fixing bacteria. *Ciência e Cultura*, São Paulo, v.44, n.5, p.310-313.
- Dowling, D.N., Broughton, W.J. 1986. Competition for nodulation of legumes. *Annual Reviews of Microbiology*. 40:131-157.

- Doyle, J. J. 1994. Phylogeny of the legume family: an approach to understanding the origins of nodulation. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*. 25:325–349.
- Drevon, J.J., Deransart, C., Irekti, H., Payer, H., Roy, G., Serraj, R. 1994. La salinité (NaCl) abaisse la conductance des nodosités de légumineuse à la diffusion de l'oxygène, in: Drevon, J.J. (Ed.), *Facteurs Limitant la Fixation Symbiotique de l'Azote dans le Bassin Méditerranéen*, INRA Editions, les colloques n°77, pp.73-84.
- Drmanac, R., Drmanac, S., Chui, G., Diaz, R., Hou, A., Jin, H., Jin, P., Kwon, S., Lacy, S., Moeur, B., Shafto, J., Swanson, D., Ukrainczyk, T., Xu, C., Little, D. 2002. Sequencing by hybridization (SBH): advantages, achievements, and opportunities. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 77:75–101.
- El-Sheikh, E.A.E., Wood, M. 1995. Nodulation and N₂ fixation by soybean inoculated with salt-tolerant rhizobia or salt-sensitive bradyrhizobia in saline soil. *Soil Biology & Biochemistry*. 27:657-661.
- Embalomatis, A., Papacosta, D.K., Katinakis, P. 1994. Evaluation of *Rhizobium meliloti* strains isolated from indigenous populations northern Greece. *Journal of Agriculture and Crop Sciences*. 172:73-80.
- Eardly, B.D., Materon, L.A., Smith, N.H., Johnson, D.A., Rumbaugh, M.D., Selander, R.K. 1990. Genetic structure of natural populations of the nitrogen-fixing bacterium *Rhizobium meliloti*. *Applied and Environmental Microbiology* 56:187–194.
- Ferreira, M.C., Hungria, M. 2002. Recovery of soybean inoculant strains from uncropped soils in Brazil. *Field Crops Research*. 79:139–152.
- Finan, T.M., Kunkel, B., de Vos, G.F., Signer, E.R. 1986. Second symbiotic megaplasmid in *Rhizobium meliloti* carrying exopolysaccharide and thiamine synthesis genes. *Journal of Bacteriology*. 167:66–72.
- Franco, A.A., Döbereiner, J. 1994. A biologia do solo e a sustentabilidade dos solos tropicais. *Summa Phytopathológica*, São Paulo, vol. 20, n.1, p.68-74.
- Frings, J.F.J. 1976. The *Rhizobium*-pea symbiosis as affected by high temperatures. Ph.D. Thesis. Wageningen Agricultural University, Germany.

- Gage, D.J. 2004. Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 68:280-300.
- Geremia, R. A., Mergaert, P., Geelen, D., Montagu, M. V., Holsters, M. 1994. The NodC protein of *Azorhizobium caulinodans* is an *N*-acetylglucosaminyltransferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA* 91:2669–2673.
- Georgiev, G.I., Atkias, C.A. 1993. Effects of salinity on N₂ fixation, nitrogen metabolism and export and diffusive conductance of cowpea root nodules. *Symbiosis*. 15:239-255.
- Giménez, E.H. 1992. Interacción planta-microorganismo. In: *Interacción Planta-Microorganismo: Biología Del Nitrogeno*, cap.1, ed. J.G. Lopez y Pla, C.L., pp. 13-23. Editorial Rueda, Madrid.
- Gonçalves, P., Castro, I.V. 2004. Efeito da aplicação de lamas residuais urbanas na diversidade da população rizobiana do solo. *Silva Lusitana*. 12(1): 95-104.
- González, E.M., Gálvez, L., Arrese-Igor, C. 2001. Absciscic acid induces a decline in nitrogen fixation that involves lehaemoglobin, but is independent of sucrose synthase activity. *Journal of Experimental Botany*. 52:285-293.
- Grange, L., Hungria, M. 2004. Genetic diversity of indigenous common bean (*Phaseolus vulgaris*) rhizobia in two Brazilian ecosystems. *Soil Biology & Biochemistry*. 36:1389–1398.
- Griffiths, A.J.F., Gelbart, W.M., Lewontin, R.C., Miller, J.H. 2002. *Modern Genetic Analysis: Integrating Genes and Genomes*. 2ed. W.H. Freeman and Company. New York.
- Heldmaier, G., Werner, D. 2003. *Environmental Signal Processing and Adaptation*. Springer.
- Henández-Armenta, R., Wien, H., Eaglesman, A.R.J., 1989. Carbohydrate partitioning and nodule functioning in common bean after heat stress. *Crop Science*. 29:1292-1297.
- Hengge-Aronis, R. 2000. The general stress response in *Escherichia coli*. In G. Storz and R. Hengge-Aronis (ed.), *Bacterial stress responses*. ASM Press, Washington, DC. pp.161-178.
- Hynes M. F., Simon R., Muller P., Neihaus K., Labes M. and Puhler A. 1986. The two megaplasmids of *Rhizobium meliloti* are involved in the effective nodulation of alfalfa. *Molecular and General Genetics* 202:356-362.

- Honma, M. A., Asomaning, M., Ausubel, F. M. 1990. *Rhizobium meliloti nodD* Genes Mediate Host-Specific Activation of *nodABC*. *Journal of Bacteriology*. 172:901–911.
- Howienson, J.G., Ewing, M.A. 1986. Acid tolerance in the *Rhizobium meliloti-Medicago* symbiosis. *Australian Journal of Agricultural Research*. 37:55-64.
- Hu, Y., Schmidhalter, U. 1998. Spatial distributions of inorganic ions and sugars contributing to osmotic adjustment in the elongating wheat leaf under saline soil conditions. *Australian Journal of Plant Physiology*. 25:591–597
- Hulton, C.S.J., Higgins, C.F., Sharp, P.M. 1991. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. *Molecular Microbiology*. 5:825–834.
- Hungria, M., Franco, A.A. 1993. Effects of high temperature on nodulation and nitrogen fixation by *Phaseolus vulgaris* L. *Plant & Soil*. 149: 95-102.
- Hunt, S., Layzell, D.B. 1993. Gas exchange of legume nodules and the reduction of nitrogenase activity. *Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology*. 44:483-511.
- Jamet, A., Sigaud, S., Van de Syde, G., Puppo, A., Herouart, D. 2003. Expression of the bacterial catalase genes during *Sinorhizobium meliloti-Medicago sativa* symbiosis and their crucial role during the infection process. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 16:217-225.
- Jensen, H.L. 1942. The occurrence of variant types in root-nodule bacteria. *Australian Journal of Science*. 5:69.
- Jones, F.R., Tisdale, W.B. 1921. Effect of soil temperature upon the development of nodules on the roots of certain legumes. *Journal of Agricultural Research*. 22:17-37.
- Kapp, D. 1996. Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen zum Infektionsverhalten von *Rhizobium meliloti* Mutanten mit veränderter Exopolysaccharidsynthese in der Symbiose mit Luzerne (*Medicago sativa* L.) Dissertation, Universität Bielefeld.
- Kasinathan, V., Wingler, A. 2004. Effect of reduced arginine decarboxylase activity on salt tolerance and on polyamine formation during salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum*. 121:101–107

- Kaschuk, G., Hungria, M., Santos, J.C.P., Berton-Junior, J.F. 2005. Differences in common beans rhizobial populations associated with soil tillage management in southern Brazil. *Soil & Tillage Research*.
- King, B.J., Layzell, D.B. 1991. Effects of increases in oxygen concentration during the argon induced decline in nitrogenase activity in root nodule of soybean. *Plant Physiology*. 96:376-381.
- Kishinesvsky, B.D., Sen, D., Weaver, R.W. 1992. Effect of high root temperature on *Bradyrhizobium*-peanut symbiosis. *Plant & Soil*. 143:275-282.
- Kosić, I.V., Britvec, M. 2006. Taxonomic composition of Pasture Flora on Ćićarija (Istria, Croatia). *Agriculture Conspectus Scientificus*. Vol. 71 No. 1 pp 1-9.
- Kuzma, M.M., Hunt, S., Layzell, D.B. 1993. Role of oxygen in the limitation and inhibition of nitrogenase activity and respiration rate in individual soybean nodule. *Plant Physiology*. 101:161-169.
- Laeremans, T. Vanderleyden, J. 1998. Review: Infection and Nodulation Signalling in *Rhizobium-Phaseolus vulgaris* Symbiosis. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 14:787 – 808.
- Laguerre, G., Allard, M.-R., Revoy, F., Amarger, N. 1994. Rapid Identification of Rhizobia by Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of PCR-Amplified 16S rRNA Genes. *Applied and Environmental Microbiology*. 60:56-63.
- Laguerre, G., Mavingui, P., Allard, M.-R., Charnay, M.-P., Louvrier, P., Mazurier, L., Rogottier-Gois, S.-L., Amarger, N. 1996. Typing of rhizobia by PCR DNA fingerprinting and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of chromosomal and symbiotic gene regions: application to *Rhizobium leguminosarum* and its different biovars. *Applied and Environmental Microbiology*. 62:2029–2036.
- Laguerre, G., Nour, S.M., Macheret, V., Sanjuan, J., Drouin, P., Amarger, N. 2001. Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. *Microbiology*. 147:981-993.
- Lockhart, D.J., Dong, H., Byrne, M.C., Follettie, M.T., Gallo, M.V., Chee, M.S., Mittmann, M., Wang, C., Kobayashi, M., Horton, H., Brown, E.L. 1996. Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nature Biotechnology*. 14:1675–1680.

- Lodwing, E. M., Hosie, A. H. F., Bourdès, A., Findlay, K., Allaway, D., Karunakaran, R., Downie, J. A. & Poole, P. S. 2003. Amino-acid Cycling Drives Nitrogen Fixation in the Legume-*Rhizobium* Symbiosis. *Nature*. 422:722 – 726.
- Long, S.R. 2001. Genes and signals in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Plant Physiology*. 125:69-72.
- Maâtallah, J., Berraho, E.B., Muñoz, S., Sanjuan, J., Llunch, C. 2002. Phenotypic and molecular characterization of chickpea rhizobia isolated from different areas of Morocco. *Journal of Applied Microbiology*. 93:531-540.
- Miller, K.J., Wood, J.M. 1996. Osmoadaptation by rhizosphere bacteria. *Annual Reviews of Microbiology*. 50:101-136.
- Minchin, F.R. 1997. Regulation of oxygen diffusion in legume nodules. *Soil Biology & Biochemistry*. 29:881-888.
- Mohammad, R.M., Akhavan-Kharazian, M., Campbell, W.F., Rumbaugh, M.D. 1991. Identification of salt and drought-tolerant *Rhizobium meliloti* L. strains. *Plant & Soil*. 134:271-276.
- Morin, P.A., Luikart, G., Wayne, R.K. 2004. the SNP workshop group. SNPs in ecology, evolution and conservation. *Trends in Ecology & Evolution*. 19:208–216.
- Mostasso, L., Mostasso, F.L., Dias, B.G., Vargas, M.A.T., Hungria, M. 2002. Selection of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobial strains for the Brazilian Cerrados. *Field Crops Research* 73:121–132.
- Muller, S.H., Pereira, P.A.A. 1995. Nitrogen fixation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as affected by mineral nitrogen supply at different growth stages. *Plant & Soil*. 177:55-61.
- Munevar, F., Wollum, A.G. 1982. Response of soybean plants to high root temperature as affected by plant cultivar and *Rhizobium* strain. *Agronomy Journal*. 74:138-142.
- Munns, D.N. 1986. Acid soil tolerance in legumes and rhizobia. In: Tinker, B., Lauchli, A. (Eds.), *Advances in Plant Nutrition*, vol. 2. Praeger Scientific, New York, pp.63-90.
- Oke, V., Long, S.R. 1999. Bacteroid formation in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Current Opinion in Microbiology*. 2:641-646.

- Oliveira, W.S, Oliveira, P.P.A., Duarte, F.R.S., Tsai, S.M. 2004. Luzerna yield and quality as function of nitrogen fertilization and symbiosis with *Sinorhizobium meliloti*. Science: Agriculture. (Piracicaba, Braz.), v.61, n.4, p.433-438.
- Paffetti, D., Daguin, F., Fancelli, S., Gnoch, S., Lippi, F. 1998. Influence of plant genotype on the selection of nodulating *Sinorhizobium meliloti* strains by *Medicago sativa*. Antonie van Leeuwenhoek. 73:3-8.
- Pankhurst, C.E., Sprent, J.I. 1976. Effects of temperature and oxygen tension on the nitrogenase and respiratory activities of turgid and water-stressed soybeans and French bean root nodules. Journal of Experimental Botany. 27:1-9.
- Pease, A.C., Solas, D., Sullivan, E.J., Cronin, M.T., Holmes, C.P., Fodor, S.P. 1994. Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis. Proceedings of the National Academy of Sciences. U. S. A. 91:5022–5026.
- Peoples, M.B., Baldock, J.A. 2001. Nitrogen dynamics of pastures: nitrogen fixation inputs, the impact of legumes on soil nitrogen fertility, and the contributions of fixed nitrogen to Australian farming systems. Australian Journal of Experimental Agriculture. 41:327-346.
- Peoples, M.B., Craswell, E.T. 1992. Biological nitrogen fixation; investments, expectations and actual contributions to agriculture. Plant & Soil, Dordrecht, v.141, n.1, p.13-39.
- Perret, X., Staehelin, C., Broughton, W. J. 2000. Molecular basis of symbiotic promiscuity. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 64:180-201.
- Pereira, S.I.A, Lima, A.I.G., Figueira, E.M.A.P. 2007. *Rhizobium leguminosarum* isolated from agricultural ecosystems subjected to different climatic influences: the relation between genetic diversity, salt tolerance and nodulation efficiency. In: Soil Ecology Research Developments. Editors: Tian-Xiao Liu. Chapter 13. Nova Science Publishers, Inc.
- Philpotts, H. 1967. The effect of soil temperature on nodulation of cowpeas (*Vigna sinensis*). Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry. 7:372-376.
- Piha, M.I., Munns, D.N. 1987. Sensitivity of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) symbiosis to high soil temperature. Plant & Soil. 98:183-194.

- Priest, F.G., Goodfellow, M. 2000. Applied Microbial Systematics. Edição Springer. Pg9.
- Possingham, J.V., Moyne, D.V., Anderson, A.J. 1965. Influence of elevated shoot and root temperature on nitrogen fixation. Plant Physiology (Bethesda). 39:561-563.
- Purves, W.K., Sadava, D., Orians, G.H., Heller, H.C. 2000. Life: The Science of Biology. 6ed. Courier Companies Inc.
- Rai, R., Nasar, S.K.T., Singh, S.J., Prasad, V. 1985. Interaction between *Rhizobium* strains and lentil (*Lens culinaris*) genotypes under salt-stress. Journal of Agricultural Sciences. 104:199-205.
- Rainbird, R.M., Atkins, C.A., Pate, J.S. 1983. Effect of temperature on nitrogenase functioning in cowpea nodules. Plant Physiology (Bethesda). 73:392-394.
- Ramberg, S., Tian, Z.X., Krol, E., Linke, B., Meyer, F., Wang, Y., PMhler, A., Weidner, S., Becker, A. 2003. Construction and validation of a *Sinorhizobium meliloti* whole genome DNA microarray: genome-wide profiling of osmoadaptive gene expression. Journal of Biotechnology 106:255–268
- Rengasamy, P. 2005. Society for Experimental Biology Annual Main Meeting: World salinisation with emphasis on Australia. Barcelona. Spain. Comparative Biochemistry and Physiology Part A 141:S337 – S348.
- Robertson, J. G., Lyttleton, P., Bullivant, S., Grayston, G. F. 1978. Membranes in Lupin Root Nodules. I. The Role of Golgi Bodies in the Biogenesis of Infection Threads and Peribacteroid Membranes. Journal of Cell Science. 30:129 – 149.
- Roumiantseva, M.L., Andronov, E.E., Sharypova, L.A., Dammam-Kalinowski, T., Keller, M., Young, J.P., Simarov, B.V. 2002. Diversity of *Sinorhizobium meliloti* from the Central Asian Alfalfa Gene Center. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 68 p. 4694-4697.
- Rosenberg, C., Boistard, P., Dénarié, J., Casse-Delbart, F. 1981. Genes controlling early and late functions in symbiosis are located on a megaplasmid in *Rhizobium meliloti*. Molecular and General Genetics. 184:326–333.

- Sadowsky, M.J., Graham, P.H. 1998. Soil Biology of *Rhizobiaceae*. In *The Rhizobiaceae*. Molecular Biology of Plant Associated Bacteria Edited by: Spaink H.P., Kodorosi, A., Hooykaas P.J.J., Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers. 155-172.
- Sairan, R.K., Tyagi, A. 2004. Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. *Current Science*. 86:407–421.
- Santos, R., Herouart, D., Puppo, A., Touati, D. 2000. Critical Protective role of bacterial superoxide dismutase in *rhizobium*-legume symbiosis. *Molecular Microbiology*. 38:750-759.
- Santos, R., Herouart, D., Sigaud, S., Puppo, A., Touati, D. 2001. Oxidative burst in luzerna-*Sinorhizobium meliloti* symbiotic interaction. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 14:86-89.
- Sawada, H., Kuykendall, L.D., Young, J.M. 2003. Changing concepts in the systematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. *Journal of General and Applied Microbiology*. 49:155-179.
- Schell, M. A. 1993. Molecular Biology of the LysR Family of Transcriptional Regulators. *Annual Review of Microbiology*. 47:597 – 626.
- Schwartz, D.C., Cantor, C.R. 1984. Separation of yeast chromosomesized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell*. 37:67–75.
- Serraj, R., Sinclair, T.R., Purcell, L.A. 1999. Symbiotic N₂ fixation response to drought. *Journal of Experimental Botany*. 331:143-155.
- Sigaud, S., Becquet, V., Frendo, P., Herouart, D., Puppo, A. 1999. Differential regulation of two divergent *Sinorhizobium meliloti* genes for HP11-like catalases during free-living growth and protective role of both catalases during symbiosis. *Journal of Bacteriology*. 181:2634-2639.
- Somasegaran, P., Hoben, H.J. 1994. Handbook for Rhizobia: Methods in Legume-*Rhizobium* Technology. Springer-Verlag. New York.
- Soupéne, E., Foussard, M., Boistard, P., Truchet, G., Batut, J. 1995. Oxygen as a key developmental regulator of *Rhizobium meliloti* N₂-fixation gene expression within the luzerna root nodule. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA*. 92:3759-3763.
- Soussi, M., Ocaña, A., Lluch, C. 1998. Effects of salt stress on growth, photosynthesis and nitrogen fixation in chick-pea (*Cicer arietinum* L.). *Journal Experimental of Botany*. 49:1329–1337

- Spaink, H. P. 1996. Regulation of Plant Morphogenesis by Lipo-Chitin Oligosaccharides. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 15:559 – 582.
- Spaink, H. P. 2000. Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *Annual Review of Microbiology*. 54:257-288.
- Sprent, J.I. 1972. The effects of water stress on nitrogen fixing root nodules. *New Phytologist*. 71:451-460.
- Sprent, J.I., Sprent, P. 1990. *Nitrogen fixing organisms*. London: Chapman and Hall, 2ed., 256p.
- Stacey, G., Burris, R.H., Evans, H.J. 1992. *Biological Nitrogen Fixation*. New York: Chapman and Hall. 943p.
- Stern, M.J., Ames, G.F.-L., Smith, N.H., Robinson, E.C., Higgins, C.F. 1984. Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome. *Cell*. 37:1015-1026.
- Streeter, J.G. 2003. Effects of drought on nitrogen fixation in soybean root nodules. *Plant, Cell & Environment*. 26:1199-1204.
- Sunnucks, P., Wilson, A.C., Beheregaray, L.B., Zenger, K., French, J., Taylor, A.C. 2000. SSCP is not so difficult: the application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. *Molecular Ecology*. 9:1699–1710.
- TeChien, C., Maundu, J., Cavaness, J., Dandurand, L.M., Orser, C.S. 1992. Characterization of salt-tolerant and salt-sensitive mutants of *Rhizobium leguminosarum biovar viciae* strain C1204b. *FEMS Microbiology Letters*. 90:135–140.
- Teyssier, C., Marchandin, H., Jumas-Bilak, E., 2004. Related Articles, The genome of alpha-proteobacteria: complexity, reduction, diversity and fluidity. *Canadian Journal of Microbiology* 50:383-396.
- Thomas, Robertson, M.J., Fukai, S., Peoples, M.B. 2004. The effect of timing and severity of water deficit on growth, development, yield accumulation and nitrogen fixation of mungbean. *Field Crop Research*. 86:67-80.
- Torsvik, V., Salte, K., Sorheim, R., Goksoyr., J. 1990. Comparison of phenotypic diversity and DNA heterogeneity in a population of soil bacteria. *Applied Environmental Microbiology*. 56: 776-781.

- Triplett, E.W., Sadowsky, M.J. 1992. Genetics of competition for nodulation of legumes. *Annual Reviews of Microbiology*. 40:399-428.
- Uhde, C., Schmidt, R., Jording, D., Selbitschka, W., Pühler, A. 1997. Stationary-Phase Mutants of *Sinorhizobium meliloti* Are Impaired in Stationary-Phase Survival or in Recovery to Logarithmic Growth. *Journal of Bacteriology*. 179:6432-6440.
- Van Overbeek, L.S., Van Elsas, J.D. 1997. Adaptation of bacteria to soil conditions: applications of molecular physiology in soil microbiology. In van Elsas J.D., Trevors, J.T., Wellington, E.M.H. (ed.), *Modern soil microbiology*. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Van Veen, J.A., van Overbeek, L.S., van Elsas, J.D. 1997. Fate and activity of microorganisms introduced into soil. *Microbiology and Molecular Biology. Rev.* 61:121-135.
- Vance, C.P., Heichel, G.H. 1991. Carbon in N₂ fixation: limitation or exquisite adaptation. *Annual Review Plant Physiology. Plant Molecular Biology*. 42:373-392.
- Velázquez, E., Mateos, P.F., Velasco, N., Santos, F., Burgos, P.A., Villadas, P., Taro, N., Martínez-Molina, E. 1999. Symbiotic characteristics and selection of autochthonous strains of *Sinorhizobium meliloti* populations in different soils. *Soil Biology & Biochemistry*. 31:1039-1047.
- Versalovic, J., Koeuth, T., Lupski, J.R. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*. 19:6823-6831.
- Versalovic, J., Schneider, M., de Bruijn, F., Lupski, J.R. 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular and Cellular Biology*. 5:25-40.
- Vincent, J.M. 1970. A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. IBP Handbook no. 15. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Vinuesa, P., Rademaker, J.L.W., de Bruijn, F.J., Werner, D. 1998. Genotypic characterization of Bradyrhizobium strains nodulating endemic woody legumes of the Canary Islands by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of genes encoding 16S rRNA (16S rDNA) and 16S-23S rDNA intergenic spacers, repetitive extragenic palindromic PCR genomic fingerprinting, and partial 16S rDNA sequencing. *Applied and Environmental Microbiology*. 64:2096-2104.

- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*. 23:4407–4414.
- Wang, D.G., Fan, J.B., Siao, C.J., Berno, A., Young, P., Sapolsky, R., Ghandour, G., Perkins, N., Winchester, E., Spencer, J., Kruglyak, L., Stein, L., Hsie, L., Topaloglou, T., Hubbell, E., Robinson, E., Mittmann, M., Morris, M.S., Shen, N., Kilburn, D., Rioux, J., Nusbaum, C., Rozen, S., Hudson, T.J., Lipshutz, R., Chee, M., Lander, E.S. 1998. Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science*. 280:1077–1082.
- Watson, R.J., Heys, R. 2006. Replication regions of *Sinorhizobium meliloti* plasmids. *Plasmid*. 55:87-98.
- Weir, B. 2006. Systematics, Specificity, and Ecology of New Zealand Rhizobia. Thesis. The University of Auckland, New Zealand.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., Lane, D.J. 1991. 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. *Journal of Bacteriology*. 173:697-703.
- Williams, J.G., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*. 18:6531–6535.
- Witty, J.F., Skotl, L., Revsbech, N.P. 1987. Direct evidence for changes in the resistance of legume root nodule to O₂ diffusion. *Journal of Experimental Botany*. 38:1120-1140.
- Xi, C., Schoeters, E., van der Leyden, J., Michels, J. 2000. Symbiosis-Specific Expression of *Rhizobium etli casA* Encoding a Secreted Calmodulin-Related Protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 97:11114 – 11119.
- Yao, P. Y., Vincent, J. M. 1969. Host Specificity in the Root Hair "Curling Factor" of *Rhizobium* sp. *Australian Journal of Biological Sciences*. 22:413 – 423.
- Zahran, H.H., Sprent, J.I., 1986. Effects of sodium chloride and polyethylene glycol on root-hair infection and nodulation of *Vicia faba* L. plants by *Rhizobium leguminosarum*. *Planta*. 167, 303-309.

- Zahran, H.H. 1999. *Rhizobium*-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 63:968-989.
- Zibri, K., Mhamdi, R., Huguet, T., Aouani, M.E. 2005. Diversity of *Sinorhizobium meliloti* and *S. medicae* nodulating *Medicago truncatula* according to host and soil origins. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 21:1009-1015.

ANEXO

Tabela 10: Resultados de DO (600 nm) em % em relação ao controle, de tolerância a diferentes temperaturas, para cada estirpe da cultivar ABT.

ABT	28°C	32°C	36°C	40°C	42°C
1	100	100	72,6	72,5	3,9
2	100	104,9	86,8	102,7	7,0
3	100	107,3	72,3	4,8	4,8
4	100	89,0	66,2	74,2	5,2
5	100	100,7	75,2	75,7	6,4
6	100	121,1	85,8	81,4	7,1
7	100	88,2	79,6	98,1	5,1
8	100	110,4	71,2	6,2	8,3
9	100	101,6	87,9	78,1	7,0
10	100	101,1	72,1	65,4	5,8
11	100	107,1	5,2	35,8	1,5
12	100	93,3	67,0	77,5	6,3
13	100	166,3	133,1	70,5	6,2
14	100	97,5	63,0	86,3	6,9
15	100	100,0	78,4	81,2	4,2
16	100	90,7	73,3	81,3	6,4
16a	100	95,6	68,4	104,7	7,5
17	100	102,8	73,4	80,4	6,7
18	100	98,9	58,1	75,0	8,2
19	100	107,3	75,9	76,9	6,0
20	100	91,8	73,0	76,5	5,4

Tabela 11: Resultados de DO (600 nm) em % em relação ao controle, de tolerância a diferentes temperaturas, para cada estirpe da cultivar Magali.

MAGALI	28°C	32°C	36°C	40°C	42°C
1	100	105,6	57,0	44,9	5,3
2a	100	101,0	54,4	50,5	5,4
2b	100	101,0	57,2	49,1	6,4
3	100	101,3	48,7	58,0	5,5
5	100	103,6	55,2	47,9	4,4
6	100	105,6	58,5	50,8	4,0
7	100	83,2	60,4	45,3	6,3
8	100	96,5	61,1	41,1	4,5
8a	100	98,8	65,1	44,7	2,7
9	100	117,2	67,7	43,9	4,0
10	100	94,6	57,9	71,1	4,1
10a	100	100,9	62,8	83,7	4,5
12	100	114,3	72,8	37,8	5,9
13	100	96,9	69,3	36,1	6,6
14	100	97,5	70,6	77,8	8,3
15	100	99,0	70,6	65,0	5,4
16	100	94,6	72,9	79,2	5,8
17	100	97,4	75,2	83,4	6,5
18	100	100,6	65,1	88,6	4,8
19	100	95,1	67,7	85,6	4,7

Tabela 12: Resultados de DO (600 nm) em % em relação ao controle de tolerância a diferentes temperaturas, para cada estirpe da cultivar Coussouls.

Coussouls	28°C	32°C	36°C	40°C	42°C
1	100	105,1	60,9	49,8	2,6
2	100	99,7	74,2	78,3	8,7
5	100	92,0	63,9	12,7	
7	100	101,1	72,9	94,4	8,3
8	100	99,4	67,6	81,0	4,5
9	100	84,9	16,8	32,0	4,8
10	100	102,6	92,5	108,9	12,3
11	100	89,4	77,5	95,4	5,7
12	100	90,4	75,4	100,7	7,7
13	100	96,5	82,2	81,0	5,9
14	100	105,9	85,1	96,1	9,4
14a	100	97,4	81,4	89,7	19,2
15	100	88,5	55,5	95,3	2,7
16	100	95,9	63,8	71,3	7,0
17	100	91,1	73,0	88,7	7,2
17a	100	84,8	54,3	67,1	10,2
17b	100	105,2	65,6	47,9	9,7
17c	100	91,6	88,3	92,4	5,2
18	100	114,9	68,0	6,7	6,7

Tabela 13: Resultados de DO (600 nm) em % em relação ao controle, de tolerância a diferentes temperaturas, para cada estirpe da cultivar Melissa.

MELISSA	28°C	32°C	36°C	40°C	42°C
1a	100	96,0	82,6	57,9	4,0
1b	100	92,6	74,4	69,8	1,1
2	100	87,9	120,1	103,6	1,8
3	100	93,1	111,1	7,6	0,4
4	100	98,3	99,7	99,7	3,8
5a	100	110,3	68,9	41,9	0,9
5b	100	91,4	89,4	101,4	3,0
5c	100	91,4	98,2	70,8	45,7
6a	100	91,0	72,8	139,5	2,5
6b	100	109,4	70,0	52,6	0,6
8	100	88,7	89,4	68,2	2,7
9	100	75,6	77,5	14,6	0,4
10a	100	78,7	97,3	148,4	3,1
10b	100	93,7	106,5	171,4	6,6
11a	100	80,1	164,5	133,9	2,8
11b	100	67,4	105,2	80,3	2,1
12	100	96,1	85,9	66,3	3,2
13	100	104,6	88,5	66,0	4,6
14	100	103,5	81,9	87,0	4,5
15	100	97,5	98,8	102,4	3,2
16	100	67,2	103,5	79,2	1,4
17	100	92,5	95,7	99,6	3,2
18	100	72,8	89,0	70,0	2,0
19	100	83,4	85,8	96,5	4,5
20	100	91,1	90,2	94,4	4,0

Tabela 14: Resultados de DO (600 nm) em % em relação ao controle, de tolerância a diferentes temperaturas, para cada estirpe da cultivar Mamuntanas.

MAMUNTANAS	28°C	32°C	36°C	40°C	42°C
1	100	97,4	100,7	77,6	1,8
2	100	95,8	94,4	67,7	2,5
3	100	98,0	100,0	81,4	4,7
4	100	95,1	105,4	6,6	2,3
5	100	94,4	106,8	94,0	2,7
6	100	101,1	102,4	70,5	2,9
7	100	98,8	100,3	82,3	4,4
8b	100	85,5	94,8	91,9	3,5
8c	100	92,4	101,5	88,4	2,7
8d	100	100,3	95,0	73,9	3,0
9	100	94,2	98,6	92,1	1,4
10	100	96,5	103,8	92,7	1,7
11	100	94,7	96,4	2,2	1,6
12	100	90,8	93,8	109,1	1,6
13	100	94,0	100,0	72,2	3,6
14	100	98,8	106,9	102,3	2,1
15	100	84,1	94,8	115,6	1,9
16	100	88,1	91,2	101,7	1,6
17	100	93,1	95,5	105,9	1,6
18	100	84,8	109,5	25,1	4,1
19	100	91,3	121,5	123,3	1,9
20	100	91,0	94,7	102,5	2,7

Tabela 15: Resultados de DO (600 nm) em % em relação ao controle, de tolerância a diferentes concentrações de NaCl, para as estirpes da cultivar ABT.

ABT	0 mM	20 mM	100 mM	500 mM	1000 mM
A1	100	102,0	121,7	71,9	1,6
A2	100	109,9	128,7	77,7	1,8
A3	100	90,5	106,7	64,6	2,8
A4	100	101,8	131,4	77,7	2,1
A5	100	98,1	122,9	72,9	3,4
A6	100	103,3	116,7	75,0	1,7
A7	100	119,6	126,3	80,4	3,7
A8	100	98,4	123,4	50,8	2,4
A9	100	105,2	110,0	79,9	4,5
A10	100	106,3	128,3	72,5	5,2
A11	100	113,1	119,2	68,2	2,3
A12	100	99,7	110,0	86,6	3,8
A13	100	98,6	119,0	71,4	3,1
A14	100	106,9	115,3	69,3	5,1
A15	100	104,7	133,5	73,5	3,1
A16	100	103,5	120,4	62,7	1,9
A16a	100	106,6	128,5	69,5	2,0
A17	100	111,7	116,2	83,0	1,2
A18	100	105,5	124,4	77,5	5,9
A19	100	105,6	136,0	90,6	2,2
A20	100	118,0	130,8	108,5	2,4

Tabela 16: Resultados de DO (600 nm) em % em relação ao controle, de tolerância a diferentes concentrações de NaCl, para as estirpes da cultivar Magali.

MAGALI	0 mM	20 mM	100 mM	500 mM	1000 mM
M1	100	92,1	111,4	84,3	3,1
M2a	100	103,6	105,7	71,7	1,8
M2b	100	85,2	97,9	56,7	1,5
M3	100	97,1	108,6	86,5	2,4
M5	100	112,8	131,2	105,1	1,7
M6	100	90,7	108,1	90,0	1,5
M7	100	96,4	108,3	88,5	2,0
M8	100	101,9	109,7	75,1	3,1
M8a	100	107,5	105,9	64,0	2,0
M9	100	105,8	112,0	65,0	2,9
M10	100	101,2	104,5	69,4	1,7
M10a	100	96,3	105,2	65,3	1,5
M12	100	96,9	101,9	57,3	1,5
M13	100	103,1	111,8	72,9	3,1
M14	100	92,3	112,1	63,3	3,0
M15	100	86,2	102,8	75,2	3,8
M16	100	105,8	117,1	84,0	1,6
M17	100	102,7	110,2	62,4	2,4
M18	100	95,8	111,1	80,4	3,9
M19	100	108,3	122,3	79,2	3,8

Tabela 17: Resultados de DO (600 nm) em % em relação ao controle, de tolerância a diferentes concentrações de NaCl, para as estirpes da cultivar Coussouls.

COUSSOULS	0 mM	20 mM	100 mM	500 mM	1000 mM
C1	100	105,6	116,4	68,9	3,3
C2	100	107,3	112,5	64,5	3,2
C5	100	103,7	106,2	73,0	0,8
C7	100	94,5	90,3	52,2	2,1
C8	100	100,8	121,8	52,7	2,5
C9	100	101,7	110,2	62,4	2,7
C10	100	93,5	109,6	75,5	4,2
C11	100	98,9	123,8	73,3	2,8
C12	100	106,1	120,6	96,0	4,0
C13	100	98,8	118,7	84,5	3,2
C14	100	88,4	95,3	82,6	2,7
C14a	100	126,7	134,4	125,3	1,8
C15	100	109,7	111,5	82,9	1,8
C16	100	105,3	117,0	85,0	2,4
C17	100	92,1	125,8	84,7	3,5
C17a	100	112,4	114,1	85,9	3,2
C17b	100	96,3	118,1	80,8	3,7
C17c	100	106,6	112,6	94,0	2,5
C18	100	97,1	118,8	80,4	2,5

Tabela 18: Resultados de DO (600 nm) em % em relação ao controle, de tolerância a diferentes concentrações de NaCl, para as estirpes da cultivar Melissa.

MELISSA	0 mM	20 mM	100 mM	500 mM	1000 mM
ML1a	100	100,0	113,5	94,2	34,7
ML1b	100	104,2	112,2	82,1	0,4
ML2	100	129,9	152,1	116,5	1,0
ML3	100	131,6	136,9	92,0	0,4
ML4	100	107,5	112,9	80,0	1,0
ML5a	100	112,6	82,9	30,6	0,5
ML5b	100	106,7	117,3	71,7	0,7
ML5c	100	177,9	209,7	157,5	111,5
ML6a	100	108,0	192,0	122,2	1,2
ML6b	100	98,4	71,1	0,8	1,2
ML8	100	111,3	130,3	100,4	22,6
ML9	100	87,3	119,9	107,1	54,7
ML10a	100	126,2	146,2	119,5	67,9
ML10b	100	141,1	165,4	97,3	69,7
ML11a	100	146,8	221,8	208,9	1,6
ML11b	100	102,6	121,4	110,0	57,6
ML12	100	96,0	98,2	57,2	1,4
ML13	100	96,8	112,3	94,9	1,6
ML14	100	104,0	112,3	89,9	0,7
ML15	100	111,0	128,0	99,6	1,2
ML16	100	103,1	137,6	112,8	1,3
ML17	100	105,5	135,2	100,4	1,2
ML18	101	97,5	130,8	108,4	1,7
ML19	102	103,5	111,0	83,7	1,1
ML20	103	98,6	113,3	84,6	1,0

Tabela 19: Resultados de DO (600 nm) em % em relação ao controle, de tolerância a diferentes concentrações de NaCl, para as estirpes da cultivar Mamuntanas.

MAMUNTANAS	0 mM	20 mM	100 mM	500 mM	1000 mM
MM1	100	111,9	114,6	109,0	1,1
MM2	100	107,6	116,0	107,3	1,4
MM3	100	115,6	123,6	95,1	1,5
MM4	100	114,7	124,3	84,6	1,2
MM5	100	110,9	123,7	81,6	1,5
MM6	100	103,6	116,7	73,3	0,8
MM7	100	100,3	108,2	89,8	1,0
MM8b	100	99,3	90,6	91,5	1,3
MM8c	100	100,0	113,5	94,2	1,8
MM8d	100	103,3	115,4	80,3	1,3
MM9	100	108,9	113,0	78,4	1,0
MM10	100	120,4	110,8	90,8	1,5
MM11	100	115,1	119,8	87,8	2,5
MM12	100	102,2	121,7	91,3	1,8
MM13	100	116,7	111,8	84,0	1,5
MM14	100	116,2	125,1	82,2	1,9
MM15	100	113,6	118,4	87,2	1,2
MM16	100	103,7	117,3	91,2	1,4
MM17	100	112,5	115,0	85,7	1,0
MM18	100	84,4	83,9	65,9	110,0
MM19	100	96,9	110,8	79,4	88,3
MM20	100	111,7	121,4	83,6	1,1

As percentagens de sobrevivência em relação ao controlo foram calculadas da seguinte maneira:

$$X = (A * 100) / C$$

A: Média da densidade óptica a 600nm das amostras de estirpes.

C: Média da densidade óptica a 600nm das amostras controle das estirpes.

X: % Sobrevivência em relação ao controlo para cada estirpe

Tabela 20: Resultados de Eficiência Simbiótica Relativa (%), para as estirpes da cultivar ABT

	<i>M. sativa</i>	<i>M. polymorpha</i>
A1	39,6	114,2
A2	2,9	5,8
A3	39,0	106,0
A4	5,8	108,9
A5	23,4	84,9
A6	0,3	80,7
A7	1,0	-9,7
A8	8,4	70,5
A9	3,4	91,9
A10	13,3	61,4
A11	-1,6	0,8
A12	9,2	97,3
A13	10,5	106,6
A14	7,4	107,7
A15	3,8	87,2
A16	2,8	77,3
A16a	4,6	46,2
A17	11,0	87,3
A18	14,0	83,9
A19	3,1	82,2
A20	4,9	94,9

Tabela 21: Resultados de Eficiência Simbiótica Relativa (%), para as estirpes da cultivar Coussouls.

	<i>M. sativa</i>	<i>M. polymorpha</i>
C1	0,4	99,6
C2	-2,9	29,4
C5	-5,6	-4,1
C7	-3,8	60,8
C8	-6,1	47,9
C9	-2,3	2,4
C10	-5,9	47,6
C11	10,4	14,6
C12	-1,9	32,4
C13	-2,8	59,3
C14	-5,1	22,0
C14a	3,2	10,2
C15	1,9	15,5
C16	-1,9	42,5
C17	-5,5	11,8
C17a	-0,2	89,8
C17b	-7,5	64,3
C17c	-3,2	10,6
C18	-3,8	88,9

Tabela 22: Resultados de Eficiência Simbiótica Relativa (%), para as estirpes da cultivar Magali.

	<i>M. sativa</i>	<i>M. polymorpha</i>
M1	11,4	87,5
M2a	6,9	108,0
M2b	-1,3	90,2
M3	11,2	90,1
M5	33,9	96,9
M6	11,3	91,4
M7	6,4	86,0
M8	25,4	76,9
M8a	4,6	119,6
M9	11,0	87,2
M10	3,6	96,1
M10a	49,5	69,4
M12	16,2	115,2
M13	3,6	120,1
M14	-5,5	11,4
M15	2,0	82,3
M16	8,6	23,5
M17	-0,6	32,4
M18	2,8	90,8
M19	9,5	9,9

Tabela 23: Resultados de Eficiência Simbiótica Relativa (%), para as estirpes da cultivar Melissa.

	<i>M. sativa</i>	<i>M. polymorpha</i>
ML1A	67,9	87,2
ML1B	50,9	71,6
ML2	55,7	31,4
ML3	39,7	13,5
ML4	28,6	21,8
ML5A	5,5	39,7
ML5B	53,7	68,2
ML5C	35,8	37,5
ML6A	32,0	53,1
ML6B	7,9	-0,2
ML8	44,4	102,9
ML9	0,7	-5,0
ML10A	54,4	85,5
ML10B	58,2	40,3
ML11A	54,7	67,6
ML11B	75,9	48,4
ML12	44,1	52,5
ML13	53,0	30,3
ML14	52,4	115,1
ML15	23,1	93,9
ML16	48,2	102,5
ML17	59,4	101,7
ML18	66,5	-0,5
ML19	46,2	73,5
ML20	55,8	98,1

Tabela 24: Resultados de Eficiência Simbiótica Relativa (%), para as estirpes da cultivar Mamuntanas.

	<i>M. sativa</i>	<i>M. polymorpha</i>
MM1	26,0	90,0
MM2	20,5	90,5
MM3	42,1	106,5
MM4	40,9	96,4
MM5	37,0	78,0
MM6	61,4	93,7
MM7	57,5	115,8
MM8B	30,2	100,5
MM8C	31,4	105,2
MM8D		
MM9	29,8	111,1
MM10	37,4	91,3
MM11	11,7	-3,6
MM12	7,1	-9,6
MM13	25,8	91,0
MM14	28,2	90,3
MM15	45,6	115,5
MM16	55,4	-10,4
MM17	5,9	-25,6
MM18	0,8	-3,6
MM19	37,1	3,4
MM20	16,7	0,7

% de Capacidade Simbiótica Relativa = [(Média Peso Seco - T0)*100]/(TN-T0).

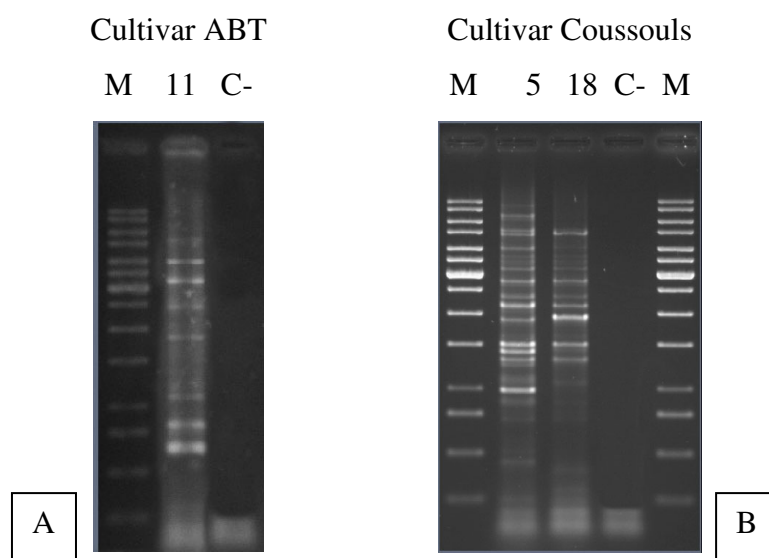


Figura 65: Géis de electroforese, resultantes da amplificação por REP-PCR, referente aos isolados de *S. meliloti* das cultivares ABT e Coussouls. M= marcador de pesos moleculares de 1kb (10000 -250 pb) C- = controlo negativo (sem DNA). A- cultivar ABT; B- cultivar Coussouls.

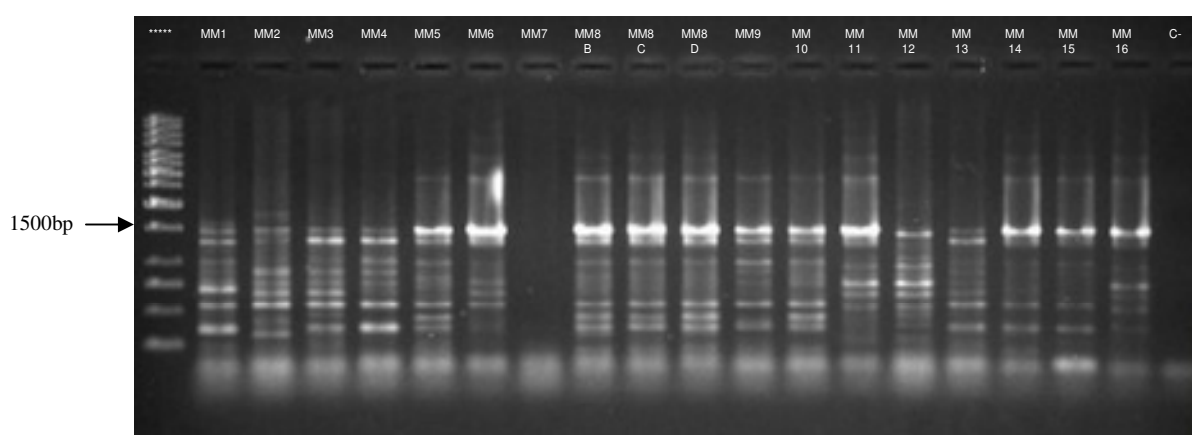


Figura 66: Gel electroforese de 16S rDNA, Resultados referentes às estirpes de Mamuntanas (MM1-MM16); ****: marcador de 1000 pb; C-: controlo negativo.

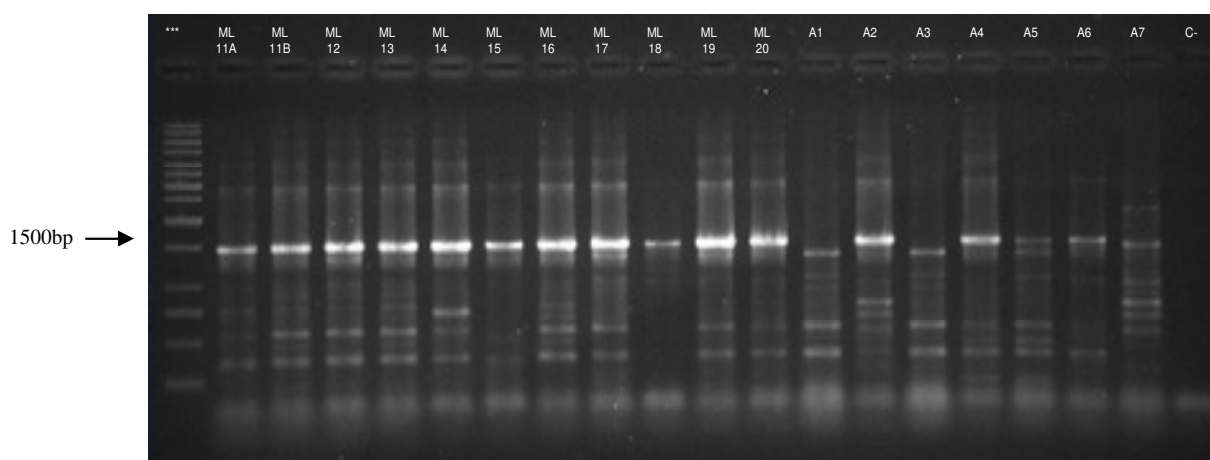


Figura 67: Gel electroforese de 16S rDNA, Resultados referentes às estirpes de Melissa (ML11a- ML20) e ABT (A1 - A7); ***: marcador de 1000 pb; C-: controlo negativo.

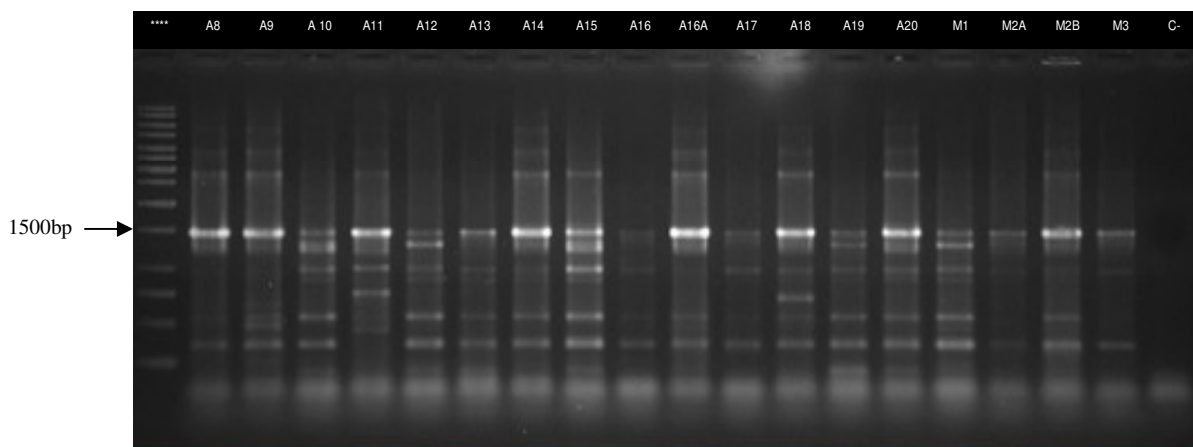


Figura 68: Gel electroforese de 16S rDNA, Resultados referentes às estirpes de ABT (A8- A20) e Magali (M1 – M3); ***: marcador de 1000 pb; C-: controlo negativo.

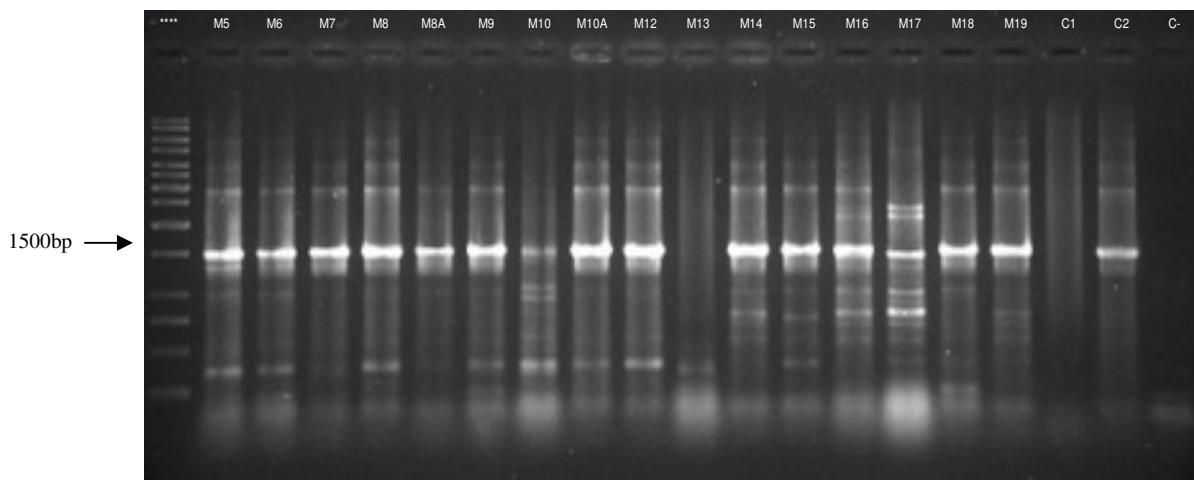


Figura 69: Gel electroforese de 16S rDNA, Resultados referentes às estirpes de Magali (M5- M19) e Coussouls (C1 e C2); ***: marcador de 1000 pb; C-: controlo negativo.

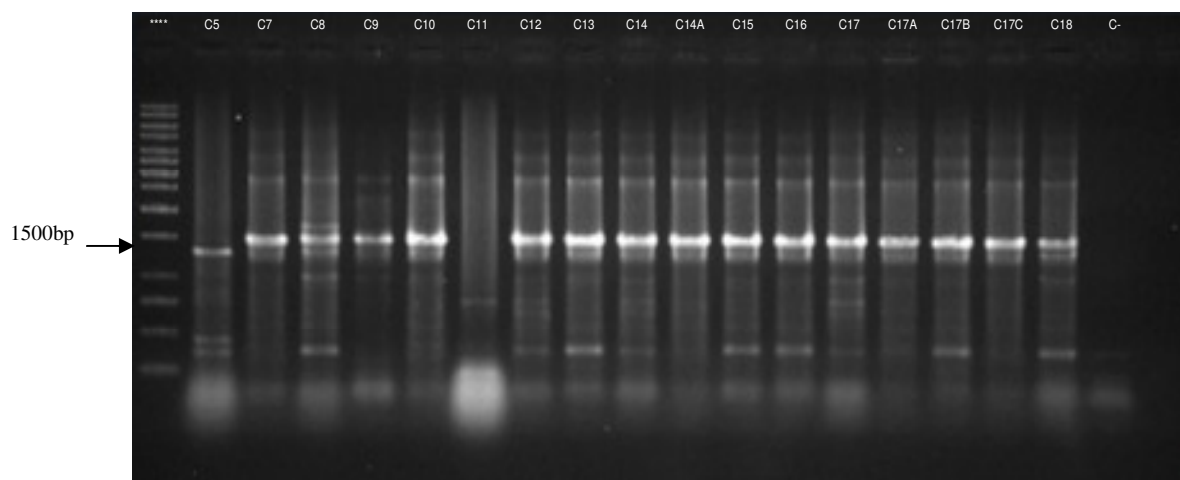


Figura 70: Gel electroforese de 16S rDNA, Resultados referentes às estirpes de Coussouls (C5- C18); ***: marcador de 1000 pb; C-: controlo negativo.